

Luana Meller Manosso

**AVALIAÇÃO DO EFEITO DA VITAMINA E EM MODELO  
ANIMAL DE COMPORTAMENTO DEPRESSIVO INDUZIDO  
POR TNF- $\alpha$**

Dissertação submetida ao Programa de  
Pós Graduação em Neurociências da  
Universidade Federal de Santa  
Catarina para a obtenção do Grau de  
Mestre em Neurociências.

Orientador: Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Ana Lúcia  
Severo Rodrigues

Florianópolis  
2013

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,  
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC.

Manosso, Luana Meller

Avaliação do efeito da vitamina E em modelo animal de comportamento depressivo induzido por TNF- $\alpha$ ; [dissertação] / Luana Meller Manosso ; orientadora, Ana Lúcia Severo Rodrigues - Florianópolis, SC, 2013. 140 p. ; 21cm

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Neurociências.

Inclui referências

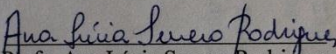
1. Neurociências. 2. Depressão. 3. Vitamina E. 4. Inflamação. I. Rodrigues, Ana Lúcia Severo. II. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Neurociências. III. Título.

**LUANA MELLER MANOSSO**

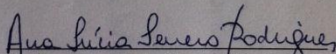
**“AVALIAÇÃO DO EFEITO DA VITAMINA E EM  
MODELO ANIMAL DE COMPORTAMENTO  
DEPRESSIVO INDUZIDO POR TNF- $\alpha$ ”**

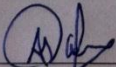
Esta dissertação foi julgada e aprovada para a obtenção do Grau  
de Mestre em Neurociências na área de Neuropsicobiologia no  
Programa de Pós-Graduação em Neurociências da Universidade  
Federal de Santa Catarina

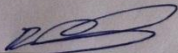
Florianópolis, 22 de fevereiro de 2013.

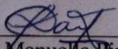
  
Profa. Ana Lúcia Severo Rodrigues  
Coordenadora do Curso

Banca Examinadora:

  
Profa. Ana Lúcia Severo Rodrigues  
Orientadora – UFSC

  
Prof. Alcir Luiz Dafré  
Membro - UFSC

  
Prof. Everson Araújo Nunes  
Membro - UFSC

  
Prof. Manuella Pinto Kaster  
Membro externo



Este trabalho é dedicado à minha  
amada família.



## AGRADECIMENTOS

À minha família, em especial aos meus pais Antoninho e Mara, ao meu irmão Angelo e aos meus avôs Zulma e Elio, por contribuírem para a formação do meu caráter, pelo amor incondicional, compreensão, paciência e aporte psicológico e financeiro.

Ao meu namorado Gabriel, pelo amor, companheirismo, compreensão nos momentos difíceis e pelo constante incentivo durante esta trajetória.

À professora Ana Lucia Severo Rodrigues, pela confiança depositada desde o início, pela orientação prestada, pelos ensinamentos e pela amizade.

Aos colegas do Laboratório de Neurobiologia da Depressão: Morgana, Vivian, Andiará, Juliana, André, Priscila, Camille, Luis, Ágatha, Francis, Maurício, Giordano, Camila, Josiane e Daniele pelo convívio e amizade. Um obrigada muito especial à Morgana, pela enorme paciência na realização dos experimentos e nos inúmeros auxílios pós-experimento; à Vivi, por dividir comigo os experimentos; à Camille, pelo companheirismo dos vários dias de blotting; à Pri por ajudar na elaboração das figuras; e aos colegas Andiará, Juliana e André por terem ajudado nos experimentos. A ajuda de vocês foi essencial para a realização deste trabalho.

Às minhas eternas amigas Bruna, Carla, Gabriela, Talita, Débora, Karina e Fernanda pela amizade de anos e momentos vividos.

Aos professores e alunos do PPG em Neurociências pelos ensinamentos, auxílios e discussões em disciplinas. Um agradecimento especial ao professor Alcir por possibilitar a realização do estágio de docência em sua disciplina e pela contribuição em artigos.

Ao Nivaldo, secretário do PPG-Neurociências, pelos vários auxílios prestados e disponibilidade.

Aos animais experimentais por viabilizarem o estudo e por contribuírem pelo aprimoramento do conhecimento científico.

À CAPES pelo apoio financeiro.





## RESUMO

A vitamina E tem várias funções fisiológicas nos humanos, incluindo ação antioxidante e anti-inflamatória, além de ser um nutriente importante para o sistema nervoso central (SNC). O papel dessa vitamina na prevenção e/ou tratamento de algumas doenças neurológicas tem sido sugerido em estudos pré-clínicos e clínicos. Além disso, o envolvimento da vitamina E na modulação da depressão, uma doença neuropsiquiátrica prevalente no mundo ocidental, é um assunto que tem emergido nos trabalhos recentes. Muitos fatores têm sido implicados na fisiopatologia da depressão, incluindo a inflamação e a apoptose neuronal. Desse modo, o objetivo desse trabalho foi investigar o efeito antidepressivo do  $\alpha$ -tocoferol, uma das formas mais abundantes da vitamina E, em um modelo animal de comportamento depressivo induzido pela citocina pró-inflamatória fator de necrose tumoral- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), avaliar o possível efeito sinérgico do  $\alpha$ -tocoferol com antidepressivos (fluoxetina, imipramina e bupropiona), bem como o envolvimento dos receptores N-metil-D-aspartato (NMDA) e da óxido nítrico sintase neuronal (nNOS). Além disso, foi investigada a influência da administração aguda de TNF- $\alpha$  e/ou  $\alpha$ -tocoferol sob os níveis de proteínas envolvidas na apoptose (Bax, Bcl2) e a fosforilação da glicogênio sintase cinase-3 $\beta$  (GSK-3 $\beta$ ) no hipocampo de camundongos. Os resultados demonstraram que: a) o TNF- $\alpha$  administrado de forma aguda (0,001 fg/sítio, i.c.v.) aumentou o tempo de imobilidade no teste de suspensão pela cauda (TSC); b) administração aguda de diferentes doses de  $\alpha$ -tocoferol (10, 30 e 100 mg/kg; p.o.) impediu o aumento no tempo de imobilidade induzido pelo TNF- $\alpha$ ; c) uma dose subativa de  $\alpha$ -tocoferol (10 mg/kg) e/ou doses subativas de fluoxetina (5 mg/kg, p.o.; inibidor seletivo da recaptação de serotonina), imipramina (0,1 mg/kg, p.o.; antidepressivo tricíclico), bupropiona (1 e 10 mg/kg, p.o.; inibidor da recaptação de dopamina e noradrenalina), MK-801 (0,001 mg/kg, p.o.; antagonista de receptores NMDA); ou 7-nitroindazol (25 mg/kg, i.p.; inibidor da nNOS) preveniu o comportamento tipo depressivo induzido por TNF- $\alpha$ ; d) nenhum dos tratamentos alterou o número de cruzamentos no teste do campo aberto (TCA), demonstrando que a atividade locomotora dos camundongos não foi afetada; e) o tratamento agudo com TNF- $\alpha$  ou  $\alpha$ -tocoferol não alterou os níveis hipocampais de Bax e Bcl2 ou a fosforilação de GSK-3 $\beta$ . Em conjunto, os resultados sugerem um efeito tipo antidepressivo sinérgico do  $\alpha$ -tocoferol com antidepressivos em um modelo de comportamento tipo depressivo

induzido por um insulto inflamatório, sugerindo que esta vitamina é uma candidata para otimizar a farmacoterapia convencional da depressão.

**Palavras-chave:** Antidepressivos. Depressão. Inflamação. Vitamina E. Teste de suspensão pela cauda.

## ABSTRACT

Vitamin E has various functions in humans, including antioxidant and anti-inflammatory actions, besides being an important nutrient for the central nervous system (CNS). The role of this vitamin in the prevention and/or treatment of some neurological diseases has been suggested by several preclinical and clinical studies. Furthermore, the involvement of vitamin E in the modulation of depression, a prevalent neuropsychiatric disease in the occidental world, is an issue that has been emerging in recent studies. Many factors have been implicated in the pathophysiology of depression, including inflammation and neuronal apoptosis. Thus, the aim of this study was to investigate the antidepressant effect of  $\alpha$ -tocopherol, one of the most abundant forms of vitamin E, in an animal model of depressive behavior induced by the inflammatory cytokine tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), and to evaluate the possible synergistic effect of  $\alpha$ -tocopherol with antidepressants (fluoxetine, bupropion and imipramine), and the involvement of N-methyl-D-aspartate (NMDA)-receptor and the neuronal nitric oxide synthase (nNOS). Furthermore, it was investigated whether TNF- $\alpha$  and/or  $\alpha$ -tocopherol might influence the expression of proteins involved in apoptosis (Bax, Bcl2) and glycogen synthase kinase-3 $\beta$  (GSK-3 $\beta$ ) phosphorylation, in the hippocampus of mice. The results showed that: a) TNF- $\alpha$  administered acutely (0.001 fg/site, i.c.v.) increases the immobility time in the tail suspension test (TST); b) Acute administration of different doses of  $\alpha$ -tocopherol (10, 30 and 100 mg/kg; p.o.) prevented the behavioral effect induced by TNF- $\alpha$ ; c) sub-effective dose of  $\alpha$ -tocopherol (10 mg/kg, p.o.) and/or sub-effectives doses of fluoxetine (5 mg/kg, p.o.; selective serotonin reuptake inhibitor), imipramine (0.1 mg/kg, p.o.; tricyclic antidepressant), bupropion (1 mg/kg, p.o.; dopamine and norepinephrine reuptake inhibitor), MK-801 (0.001 mg/kg, p.o.; NMDA receptor antagonist) or 7-nitroindazole (25 mg/kg, i.p.; nNOS inhibitor) prevented the depressive-like effect induced by TNF- $\alpha$ ; d) none of the treatments altered the number of crossings in the open field test, demonstrating that the locomotor activity of mice was not affected, e) acute treatment with TNF- $\alpha$  and/or  $\alpha$ -tocopherol did not alter the levels of Bax and Bcl2 or the phosphorylation of GSK-3 $\beta$ . Together, our results show a synergistic antidepressant-like effect of  $\alpha$ -tocopherol with antidepressants against the depressive-like behavior induced by an inflammatory insult, suggesting that this vitamin may be interesting to optimize conventional pharmacotherapy of depression.

**Keywords:** Antidepressant. Depression. Inflammation. Vitamin E. Tail suspension test.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Triptofano e inflamação: um estímulo para a via das quinureninas .....	30
Figura 2 – Envolvimento da Bax, Bcl2 e GSK-3 na apoptose .....	36
Figura 3 – Estrutura química da vitamina E.....	39
Figura 4 – Estudos clínicos que correlacionam vitamina E e depressão. .....	47
Figura 5 – Teste de suspensão pela cauda .....	55
Figura 6 – Teste do campo aberto .....	56
Figura 7 – Esquema do protocolo da administração de diferentes doses de $\alpha$ -tocoferol com TNF- $\alpha$ .....	57
Figura 8 – Esquema do protocolo de associação do $\alpha$ -tocoferol com antidepressivos (fluoxetina, imipramina e bupropiona) e TNF- $\alpha$ .....	58
Figura 9 – Esquema do protocolo de associação do $\alpha$ -tocoferol com MK-801 e TNF- $\alpha$ .....	59
Figura 10 – Esquema do protocolo de associação do $\alpha$ -tocoferol com 7-Nitroindazol e TNF- $\alpha$ .....	60
Figura 11 – Esquema do protocolo para as análises bioquímicas .....	61
Figura 12 – Efeito da administração p.o. de $\alpha$ -tocoferol (T) em diferentes doses (variando de 10 - 100 mg/kg) associada com administração i.c.v. de TFN- $\alpha$ (0,001 fg/sítio) ou veículo sobre o tempo de imobilidade no TSC (painel A) e número de cruzamentos no TCA (painel B).....	66
Figura 13 – Efeito da administração de dose subativa de $\alpha$ -tocoferol (T) (10 mg/kg, p.o.) e/ou dose subativa de fluoxetina (FLU) (5 mg/kg, p.o.), associada com administração i.c.v. de TFN- $\alpha$ (0,001 fg/sítio) ou veículo sobre o tempo de imobilidade no TSC (painel A) e número de cruzamentos no TCA (painel B).....	68
Figura 14 – Efeito da administração de dose subativa de $\alpha$ -tocoferol (T) (10 mg/kg, p.o.) e/ou dose subativa de imipramina (IMI) (0,1 mg/kg, p.o.), associada com administração i.c.v. de TFN- $\alpha$ (0,001 fg/sítio) ou veículo sobre o tempo de imobilidade no TSC (painel A) e número de cruzamentos no TCA (painel B).....	70

Figura 15 – Efeito da administração de dose subativa de  $\alpha$ -tocoferol (T) (10 mg/kg, p.o.) e/ou dose subativa de bupropiona (BUP) (1 mg/kg, p.o.), associada com administração i.c.v. de TFN- $\alpha$  (0,001 fg/sítio) ou veículo sobre o tempo de imobilidade no TSC (painel A) e número de cruzamentos no TCA (painel B) ..... 72

Figura 16 – Efeito da administração de dose subativa de  $\alpha$ -tocoferol (T) (10 mg/kg, p.o.) e/ou dose subativa de MK-801 (0,001 mg/kg, p.o.), associada com administração i.c.v. de TFN- $\alpha$  (0,001 fg/sítio) ou veículo sobre o tempo de imobilidade no TSC (painel A) e número de cruzamentos no TCA (painel B) ..... 74

Figura 17 – Efeito da administração de dose subativa de  $\alpha$ -tocoferol (T) (10 mg/kg, p.o.) e/ou dose subativa de 7-nitroindazol (7-Nitro) (25 mg/kg, p.o.), associada com administração i.c.v. de TFN- $\alpha$  (0,001 fg/sítio) ou veículo sobre o tempo de imobilidade no TSC (painel A) e número de cruzamentos no TCA (painel B) ..... 77

Figura 18 – Efeito da administração de dose subativa (10 mg/kg, p.o.) ou ativa (30 mg/kg, p.o.) de  $\alpha$ -tocoferol (T) ou dose ativa de bupropiona (BUP) (10 mg/kg, p.o.), associada com administração i.c.v. de TFN- $\alpha$  (0,001 fg/sítio) ou veículo sobre o conteúdo da Bax (painel A) e Bcl2 (painel B), no hipocampo de camundongos ..... 79

Figura 19 – Efeito da administração de dose subativa (10 mg/kg, p.o.) ou ativa (30 mg/kg, p.o.) de  $\alpha$ -tocoferol (T) ou dose ativa de bupropiona (BUP) (10 mg/kg, p.o.), associada com administração i.c.v. de TFN- $\alpha$  (0,001 fg/sítio) ou veículo sobre a fosforilação da GSK-3 $\beta$  no hipocampo de camundongos ..... 80

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Critérios diagnósticos da depressão de acordo com o Manual Diagnóstico e Estatístico de Transtornos Mentais, quarta edição (DSM-IV) .....	22
Tabela 2 – Valores de F e de p do experimento da administração aguda de diferentes doses de $\alpha$ -tocoferol com TNF- $\alpha$ .....	65
Tabela 3 – Valores de F e de p do experimento da associação do $\alpha$ -tocoferol com fluoxetina .....	67
Tabela 4 – Valores de F e de p do experimento da associação do $\alpha$ -tocoferol com imipramina .....	69
Tabela 5 – Valores de F e de p do experimento da associação do $\alpha$ -tocoferol com bupropiona .....	71
Tabela 6 – Valores de F e de p do experimento da associação do $\alpha$ -tocoferol com MK-801 .....	73
Tabela 7 – Valores de F e de p do experimento da associação do $\alpha$ -tocoferol com 7-Nitroindazol .....	76
Tabela 8 – Valores de F e de p das análises bioquímicas: Bax e Bcl2.....	78
Tabela 9 – Valores de F e de p das análises bioquímicas: GSK-3 $\beta$ .....	80





## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

$\alpha$ -TTP = proteína de transferência de  $\alpha$ -tocoferol  
Akt = proteína cinase B  
ANOVA = análise de variância  
BDI = Beck Depression Inventory  
BH = homologia à Bcl2  
CES-D = Center for Epidemiologic Studies Depression  
CEUA = Comissão de Ética no Uso de Animais  
COBEA = Colégio Brasileiro de Experimentação Animal  
DISC = complexo de sinalização indutor de morte  
DO = densidade óptica  
DSM = Manual Diagnóstico e Estatístico de Transtornos Mentais  
E.P.M. = erro padrão da média  
ERK = cinase regulada por sinal extracelular  
GDS = Geriatric Depression Score  
GSK-3 = glicogênio sintase cinase-3  
HDL = lipoproteína de alta densidade  
HDRS = Hamilton Depression Rating Scale  
HPA = hipotálamo-pituitária-adrenal  
i.c.v. = intracerebroventricular  
IFN = interferon  
IL = interleucina  
IDO = indoleamina 2,3-dioxigenase  
iNOS = óxido nítrico sintase induzível  
i.p. = intraperitoneal  
ISRS = inibidor seletivo da recaptação de serotonina  
LDL = lipoproteína de baixa densidade  
LPL = lipase lipoproteica  
LPS = lipopolissacarídeo  
MAO = monoamina oxidase  
MAPK = proteína cinase ativada por mitógeno  
NF $\kappa$ B = fator nuclear  $\kappa$ B  
NMDA = N-metil-D-aspartato  
nNOS = óxido nítrico sintase neuronal  
NO = óxido nítrico  
NOS = óxido nítrico sintase  
PCR = proteína C reativa  
PI3K = fosfatidilinositol 3-cinase  
PKA = proteína cinase A  
PKC = proteína cinase C

p.o. = *per oral* (via oral)

PUFA = ácido graxo poli-insaturado

RNS = espécies reativas de nitrogênio

ROS = espécies reativas de oxigênio

SNC = sistema nervoso central

SR-BI = receptor *scavenger* classe B tipo I

TCA = teste do campo aberto

TNF = teste do nado forçado

TNF- $\alpha$  = fator de necrose tumoral  $\alpha$

TSC = teste da suspensão pela cauda

VLDL = lipoproteína de muito baixa densidade

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO .....</b>	<b>21</b>
1.1 DEPRESSÃO .....	21
1.1.1 Sistemas monoaminérgico, glutamatérgico e via da L-arginina óxido nítrico .....	23
1.1.2 Inflamação .....	26
1.1.3 Relação da depressão com a neurogênese e a morte celular .....	31
1.2 VITAMINA E .....	38
1.2.1 Funções da vitamina E .....	41
1.2.2 Vitamina E no SNC .....	42
1.3 VITAMINA E E DEPRESSÃO .....	44
1.3.1 Estudos pré-clínicos .....	44
1.3.2 Estudos clínicos .....	44
1.4 MODELOS ANIMAIS DE DEPRESSÃO .....	47
<b>2 JUSTIFICATIVA .....</b>	<b>49</b>
<b>3 OBJETIVOS .....</b>	<b>51</b>
3.1 OBJETIVO GERAL .....	51
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	51
<b>4 MATERIAL E MÉTODOS .....</b>	<b>53</b>
4.1 ANIMAIS .....	53
4.2 DROGAS E VIAS DE ADMINISTRAÇÃO .....	53
4.3 TESTES COMPORTAMENTAIS .....	54
4.3.1 Teste da suspensão pela cauda .....	54
4.3.2 Avaliação da atividade locomotora .....	55
4.4 PROTOCOLOS EXPERIMENTAIS .....	56
4.4.1 Investigação da administração aguda de diferentes doses de $\alpha$ -tocoferol com TNF- $\alpha$ .....	56
4.4.2 Investigação da associação do $\alpha$ -tocoferol com antidepressivos e TNF- $\alpha$ .....	57
4.4.3 Investigação da associação do $\alpha$ -tocoferol com MK-801 e TNF- $\alpha$ .....	58
4.4.4 Investigação da associação do $\alpha$ -tocoferol com 7-nitroindazol e TNF- $\alpha$ .....	59
4.5 ANÁLISES BIOQUÍMICAS .....	60
4.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA .....	62
<b>5 RESULTADOS .....</b>	<b>65</b>
5.1 INVESTIGAÇÃO DA ADMINISTRAÇÃO AGUDA DE DIFERENTES DOSES DE $\alpha$ -TOCOFEROL COM TNF- $\alpha$ .....	65
5.2 INVESTIGAÇÃO DA ASSOCIAÇÃO DO $\alpha$ -TOCOFEROL COM ANTIDEPRESSIVOS E TNF- $\alpha$ .....	67
5.3 INVESTIGAÇÃO DA ASSOCIAÇÃO DO $\alpha$ -TOCOFEROL COM MK-801 E TNF- $\alpha$ .....	73

5.4 INVESTIGAÇÃO DA ASSOCIAÇÃO DO $\alpha$ -TOCOFEROL COM 7-NITROINDAZOL E TNF- $\alpha$ .....	75
5.5 ANÁLISES BIOQUÍMICAS .....	78
<b>6 DISCUSSÃO .....</b>	<b>81</b>
<b>7 CONCLUSÃO .....</b>	<b>97</b>
<b>PERSPECTIVAS.....</b>	<b>99</b>
<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>101</b>

# 1 INTRODUÇÃO

## 1.1 DEPRESSÃO

De acordo com a Associação Americana de Psiquiatria (AMERICAN PSYCHIATRY ASSOCIATION, 1994), os transtornos de humor são crônicos, severos e potencialmente ameaçadores de vida. Esses transtornos estão associados com anormalidades tanto comportamentais quanto cognitivas e várias regiões cerebrais podem estar envolvidas na neuroanatomia desses transtornos, como córtex pré-frontal, tálamo, amígdala, hipocampo, estriado, entre outras (DREVETS *et al.*, 1992; FRANGOU, 2009). A etiologia e neurobiologia dos transtornos de humor ainda não estão completamente elucidadas, mas sabe-se que esses transtornos são multifatoriais e envolvem tanto fatores ambientais quanto fatores genéticos e epigenéticos (MANJI *et al.*, 2001; NESTLER *et al.*, 2002; TSANKOVA *et al.*, 2007).

Dentre os transtornos de humor, destaca-se a depressão, que é um transtorno de humor do tipo unipolar com alta prevalência e incidência, principalmente no mundo ocidental. Estima-se que cada pessoa tem um risco de cerca de 17% em desenvolver algum episódio depressivo ao longo da sua vida (KESSLER *et al.*, 2005; BERTON; NESTLER, 2006; DUMAN; VOLETI, 2012). Além disso, a depressão é mais comum em mulheres do que em homens (2:1) e a faixa etária mais afetada é dos 25 aos 44 anos (WONG; LICINIO, 2001; TIERNEY, 2007).

A Organização Mundial de Saúde considera que a depressão é uma das doenças mais onerosas para a sociedade, com altos custos sociais e pessoais, diminuição da produtividade do trabalho e aumento na utilização dos serviços de saúde (KATON, 2003; SIMON, 2003; NEMEROFF, 2007). A Organização Mundial de Saúde também estima que a depressão unipolar maior será a principal causa de incapacitação em 2030 (LÉPINE, BRILEY, 2011).

Pacientes com depressão apresentam uma diminuição na qualidade de vida, com altas taxas de comorbidade e mortalidade, trazendo várias consequências sociais, psicológicas, físicas e econômicas, além de propiciar uma alta taxa de suicídio (NEMEROFF; OWENS, 2002; NEMEROFF, 2007; TIERNEY, 2007; DUMAN; VOLETI, 2012). No que diz respeito às comorbidades, é interessante referir que várias doenças estão associadas com a depressão, principalmente diabetes tipo II, doença cardiovascular, hipertensão, acidente vascular cerebral, doenças neurodegenerativas, entre outras

(GAVARD; LUSTMAN; CLOUSE, 1993; JONAS; FRANKS; INGRAM, 1997; EVANS *et al.*, 2005; ANISMAN; MERALI; HAYLEY, 2008; WHOOLEY, 2009; WOLKOWITZ; REUS; MELLON, 2011).

Os principais sintomas da depressão são humor deprimido e/ou anedonia, que é a perda de prazer por atividades antes consideradas prazerosas. Entretanto, outros sintomas também podem estar presentes, como por exemplo, alteração no peso, no apetite e no sono, fadiga, sentimento de culpa, dificuldade de concentração, pensamento suicida, entre outros. Para ser diagnosticado com depressão, o indivíduo deve apresentar, por um período de no mínimo duas semanas, pelo menos cinco dos sintomas listados na **Tabela 1**, sendo que, obrigatoriamente, a pessoa deve apresentar o primeiro (humor deprimido) e/ou o segundo (anedonia) sintoma listado (AMERICAN PSYCHIATRY ASSOCIATION, 1994).

**Tabela 1** - Critérios diagnósticos da depressão de acordo com o Manual Diagnóstico e Estatístico de Transtornos Mentais, quarta edição (DSM-IV).

---

1. Humor deprimido

2. Anedonia

---

3. Falta de esperança, desespero, sentimento de culpa ou desvalia

4. Perda de peso e apetite/ ganho de peso ou apetite

5. Agitação psicomotora/ letargia

6. Fadiga ou falta de energia

7. Pensamentos recorrentes de morte ou suicídio

8. Dificuldade de concentração

9. Insônia/hipersônia

---

Fonte: Manual Diagnóstico e Estatístico dos Distúrbios Mentais (AMERICAN PSYCHIATRY ASSOCIATION, 1994)

A hipótese monoaminérgica foi a primeira hipótese postulada para explicar a fisiopatologia da depressão, sugerindo que esse distúrbio resulte de uma diminuição das monoaminas (serotonina, noradrenalina e dopamina) na fenda sináptica ou de alguma alteração em seus receptores, levando a um prejuízo na neurotransmissão monoaminérgica (WONG; LICINIO, 2001; ELHWUEGI, 2004). No entanto, considerando que esta hipótese possui várias limitações como o atraso na remissão dos sintomas após o tratamento com antidepressivos (NEMEROFF; OWENS, 2002), grande número de respostas parciais ou ausência de respostas (RUHÉ *et al.*, 2011), outras hipóteses, sistemas de

neurotransmissores ou fatores têm sido implicados na fisiopatologia e/ou tratamento deste transtorno de humor. Dentre eles destacam-se: o glutamato e os receptores N-metil-D-aspartato (NMDA) (SANACORA *et al.*, 2008; GHASEMI; RAZA; DEHPOUR, 2010), a via da L-arginina-óxido nítrico (NO) (HARKIN *et al.*, 1999; MORETTI *et al.*, 2011), a hipótese neurotrófica (DUMAN *et al.*, 1997; DUMAN; MONTEGGIA, 2006), as vias inflamatórias (MAES, 2008; CATENA-DELL'OSSO *et al.*, 2011); a desregulação no eixo hipotálamo-pituitária-adrenal (HPA) (PARIANTE; MILLER, 2001; CHOPRA; KUMAR; KUHAD, 2011), o estresse oxidativo (IRIE *et al.*, 2005; SARANDOL *et al.*, 2007; BEHR *et al.*, 2012), entre outras.

A seguir serão discutidas as hipóteses relacionadas com o presente trabalho.

### **1.1.1 Sistemas monoaminérgico, glutamatérgico e via da L-arginina óxido nítrico**

A hipótese monoaminérgica da depressão foi postulada por volta de 1965 e postula que essa doença pode ser consequência, pelo menos em parte, de uma redução dos níveis de monoaminas na fenda sináptica ou alteração nos receptores desses neurotransmissores, prejudicando a neurotransmissão monoaminérgica. Essa hipótese é reforçada pelo conhecimento do mecanismo de ação da maioria dos antidepressivos utilizados na clínica, que se baseia, principalmente, no aumento da disponibilidade dos neurotransmissores monoaminérgicos na fenda sináptica (SCHILDKRAUT, 1965; ELHWUEGI, 2004; NEMEROFF, 2007; PRINS *et al.*, 2011).

O sistema serotoninérgico foi o primeiro sistema cujo envolvimento na etiologia e tratamento da depressão foi demonstrado. A serotonina é um importante neurotransmissor associado a vários efeitos fisiológicos do sistema nervoso central (SNC), dentre eles, destaca-se seu papel na ingestão de alimentos, termorregulação, ciclo sono e vigília, memória, além de ser importante na regulação do humor. (CHASE; MURPHY, 1973; COCCARO *et al.*, 1990; DAUBERT; CONDRON, 2010). Pacientes com depressão apresentam alteração nos níveis de serotonina, que são revertidas após a utilização de antidepressivos como os inibidores seletivos da recaptação de serotonina (ISRS) (RISCH; NEMEROFF, 1992; ELHWUEGI, 2004; WONG *et al.*, 2005). Estudos com depleção de triptofano, que é o aminoácido precursor da serotonina, confirmam a relação entre serotonina e depressão (TAYLOR *et al.*, 2005). Corroborando com essas

informações, uma recente revisão demonstrou o envolvimento de diversas classes de receptores para serotonina na ação terapêutica de drogas antidepressivas (ARTIGAS, 2012).

Em paralelo ao sistema serotoninérgico, o sistema noradrenérgico também está envolvido na fisiopatologia da depressão, sendo alvo no tratamento com antidepressivos (MILLAN, 2004; TAYLOR *et al.*, 2005). A noradrenalina é um importante mensageiro químico encontrado no sistema nervoso e possui funções endócrinas e autonômicas, além de ser importante para o aprendizado, memória e regulação do estado afetivo, incluindo regulação do humor (WANG *et al.*, 1999). A depressão parece estar associada a uma hipofunção do sistema noradrenérgico, sendo que alguns antidepressivos agem através de um aumento na disponibilidade de noradrenalina na fenda sináptica (TAYLOR *et al.*, 2005). Um dos alvos dos antidepressivos, por exemplo, são os transportadores de noradrenalina, que são os responsáveis pela recaptação da noradrenalina para o neurônio pré-sináptico (BENMANSOUR *et al.*, 2004).

Alterações no sistema dopaminérgico também estão implicadas na depressão (DAILY *et al.*, 2004; MILLAN, 2004). A dopamina é um neurotransmissor importante no circuito neuronal que controla o sistema de recompensa (HABER; KNUTSON, 2010). Além disso, disfunções nas vias dopaminérgicas mesolímbicas e mesocorticais estão implicadas em algumas características da depressão, como melancolia, anedonia e alterações cognitivas (MILLAN, 2004). É interessante notar que uma característica comum de alguns antidepressivos é aumentar, de forma indireta, os níveis extracelulares de dopamina no córtex frontal (MILLAN; LEJEUNE; GOBERT, 2000). Além disso, embora os antidepressivos normalmente não aumentem a liberação de dopamina no núcleo accumbens, o tratamento crônico com esses medicamentos reforça a sinalização dopaminérgica e produz alterações adaptativas em receptores mesolímbicos (VETULANI; NALEPA, 2000). Vale ressaltar que, na clínica, podem ser utilizados antidepressivos como a bupropiona, que é inibidor da recaptação de noradrenalina e dopamina, cuja eficácia tem sido comparada a de outras classes de antidepressivos (STAHL *et al.*, 2004).

Além do sistema monoaminérgico, acredita-se que os receptores NMDA, um subtipo de receptor ionotrópico do neurotransmissor glutamato, também estejam envolvidos na fisiopatologia da depressão (SKOLNICK, 1999; ZARATE *et al.*, 2010). O glutamato é o principal neurotransmissor excitatório do SNC e está envolvido na plasticidade sináptica, aprendizado e memória (TZSCHENTKE, 2002; PLATT,



2007). Estudos demonstram a ocorrência de alterações nos níveis desse neurotransmissor no líquido cefalorraquidiano de pessoas com depressão ou outros transtornos de humor (LEVINE *et al.*, 2000; FRYE *et al.*, 2007), além de um nível mais elevado de glutamato no plasma (MITANI *et al.*, 2006) e no encéfalo (HASHIMOTO; SAWA; IYO, 2007).

Sabe-se ainda, que antagonistas de receptores NMDA apresentam atividade antidepressiva em estudos pré-clínicos e clínicos (MATHEW; KEEGAN; SMITH, 2005; GARCIA *et al.*, 2008; CHUNG, 2012; SANACORA; TRECCANI; POPOLI, 2012). Zarate e colaboradores (2006) e Price e colaboradores (2009), por exemplo, demonstraram que 2 horas após uma administração de uma dose subanestésica de cetamina (um antagonista de receptores NMDA) houve uma melhora nos sintomas depressivos em pacientes diagnosticados com depressão. Além disso, Zarate *et al.* (2006) perceberam que a melhora dos sintomas depressivos persistia por 1 semana após a administração aguda de cetamina em pacientes com diagnóstico de depressão. Outros estudos evidenciaram que inibidores do receptor NMDA conseguiram modular o sistema monoaminérgico, aumentando os níveis de dopamina e serotonina e alterando a densidade dos receptores serotoninérgicos 5-HT<sub>1A</sub> no encéfalo de ratos (LÖSCHER; ANNIES; HÖNACK, 1991; WEDZONY *et al.*, 1997).

Uma das consequências da ativação dos receptores NMDA é a ativação da enzima óxido nítrico sintase neuronal (nNOS) que catalisa a conversão de L-arginina em NO e L-citrulina em resposta ao influxo de íons cálcio mediado pelos receptores NMDA (CALABRESE *et al.*, 2007; STEINERT; CHERNOVA; FORSYTHE, 2010). O NO tem sido considerado uma substância neurotransmissora, além de modular os neurônios monoaminérgicos. O NO também está envolvido em patologias do SNC, como esquizofrenia, ansiedade e depressão (ESPLUGUES, 2002; DHIR; KULKARNI, 2011), além de estar implicado na morte neuronal induzida pelo glutamato (STRIJBOS; LEACH; GARTHWAITE, 1996).

Na depressão, estudos apontam que a administração de L-arginina e, por consequência, o aumento de NO, reverte o efeito antidepressivo de alguns medicamentos como a bupropiona e imipramina e a duloxetina (HARKIN *et al.*, 1999; DHIR; KULKARNI, 2007; KRASS *et al.*, 2011; ZOMKOWSKI *et al.*, 2012). Além disso, Lee e colaboradores (2006) evidenciaram que a elevação plasmática de NO foi associada ao aumento de tentativas de suicídio, principalmente em pacientes com depressão. Corroborando com esses dados, já foi

demonstrado que alguns antidepressivos que agem no sistema serotoninérgico diminuem a atividade NOS *in vitro*, entretanto, isso não ocorre *ex vivo* (em doses usadas na clínica), o que faz os autores sugerirem que os antidepressivos serotoninérgicos possuem uma ação secundária nos receptores NMDA ao invés de agirem diretamente na enzima NOS (WEGENER *et al.*, 2003).

### 1.1.2 Inflamação

A depressão também tem sido associada com alterações nas vias inflamatórias (DANTZER *et al.*, 2008; MAES, 2008; MCNALLY; BHAGWAGAR; HANNESTAD, 2008; DINAN, 2009; MILLER; MALETIC; RAISON, 2009; MAES *et al.*, 2011; LEONARD; MAES, 2012). A inflamação é um processo complexo que requer vários tipos de células e moléculas que irão agir de maneira coordenada com o objetivo de controlar algum trauma ou dano tecidual (CHARO; RANSOHOFF, 2006; COSTA; INCIO; SOARES, 2007). Uma das moléculas importantes para o controle da inflamação são as citocinas, as quais fazem parte de uma família de proteínas sinalizadoras que podem ser secretadas por diferentes tipos celulares e que possuem várias atividades biológicas. Algumas dessas citocinas intensificam o processo inflamatório, chamadas de citocinas pró-inflamatórias. Em contrapartida, outras citocinas, chamadas de citocinas anti-inflamatórias, agem de maneira oposta, ou seja, auxiliam na diminuição da inflamação (WATKINS; MAIER; GOEHLER, 1995; HURLEY; TIZABI, 2012). Embora a descoberta da presença de citocinas no encéfalo tenha ocorrido há algumas décadas, a função fisiológica e patológica das citocinas nesse órgão ainda não está totalmente elucidada, mas sugere-se que essas citocinas estejam envolvidas em algumas situações como, por exemplo, infecção, trauma, isquemia, doenças neurodegenerativas, depressão, entre outras (KHAIROVA *et al.*, 2009; DOWLATI *et al.*, 2010; HURLEY; TIZABI, 2012).

Apesar de o processo inflamatório ser benéfico em alguns casos, uma desregulação na produção dessas citocinas, levando a uma situação de inflamação crônica, está associada com algumas doenças, como psoríase, artrite reumatoide, síndrome metabólica, câncer, doenças inflamatórias intestinais, além de doenças neurológicas (MCGEER; MCGEER, 2004; COSTA; INCIO; SOARES, 2007; HURLEY; TIZABI, 2012).

No encéfalo, a ativação de vias inflamatórias pode contribuir para potencializar o estresse oxidativo, reduzir o suporte neurotrófico, aumentar

a liberação de glutamato por neurônios e diminuir a sua recaptação por astrócitos, causando excitotoxicidade glutamatérgica e perda de elementos gliais (principalmente de oligodendrócitos), características que também são encontradas em pacientes com depressão (MAES, 2008; MCNALLY; BHAGWAGAR; HANNESTAD, 2008; MILLER; MALETIC; RAISON, 2009). Além disso, acredita-se que as citocinas inflamatórias exerçam um papel neoromodulador, influenciando tanto o comportamento quanto as respostas neuroquímicas e neuroendócrinas subjacentes aos transtornos depressivos (SCHIEPERS; WICHERS; MAES, 2005).

Como revisado por Krishnadas e Cavanagh (2012), a relação entre a depressão e a inflamação surge principalmente devido a três razões: a) a depressão está associada com o aumento de marcadores inflamatórios; b) doenças inflamatórias (periférica ou a nível de SNC) aumentam o risco de depressão; c) doentes tratados com citocinas têm um risco aumentado de desenvolver depressão.

Conforme demonstrado em uma meta-análise (HOWREN; LAMKIN; SULS, 2009), a depressão foi positivamente associada com os níveis séricos ou plasmáticos de proteína C-reativa (PCR), interleucina (IL)-1 e IL-6, que são citocinas inflamatórias. Em outra meta-análise, após avaliar 24 estudos, Dowlati e colaboradores (2010) evidenciaram um aumento da IL-6 e de fator de necrose tumoral- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) em pacientes com depressão. Além disso, outro estudo demonstrou que os pacientes deprimidos tinham diminuição dos níveis séricos de IL-10, uma citocina anti-inflamatória, e um aumento na relação IL-6/IL-10 (DHABHAR *et al.*, 2009). Cassidy-Bushrow *et al.* (2012) também associaram sintomas depressivos com aumento da inflamação em mulheres Africano-Americanas grávidas. No entanto, outro estudo, que avaliou diversas citocinas inflamatórias em pacientes com depressão, não encontrou nenhuma mudança nos níveis dessas citocinas nesses indivíduos quando comparado com o grupo controle (EINVIK *et al.*, 2012).

Como revisado por O'Brien, Scott e Dinan (2004), IL-1, interferon (IFN)- $\alpha$ , IFN- $\gamma$  e TNF- $\alpha$  aumentam a expressão do transportador de serotonina, levando à depleção de serotonina na fenda sináptica. Alguns estudos também sugerem que a susceptibilidade à depressão é aumentada na presença de polimorfismos de genes de citocinas como, por exemplo, dos genes que codificam o TNF- $\alpha$  e IL-1 (JUN *et al.*, 2003; FERTUZHINHOS *et al.*, 2004). Em modelos animais, a administração (sistêmica ou centralmente) de citocinas pró-inflamatórias, tais como o IFN- $\alpha$  e TNF- $\alpha$  conduz a um comportamento

semelhante à depressão (KASTER *et al.*, 2012; PING *et al.*, 2012). Além disso, em pessoas com câncer ou hepatite C crônica, a terapia com IL-2 ou IFN- $\alpha$  leva à sintomatologia depressiva (CAPURON; RAVAUD; DANTZER, 2000; BONACCORSO *et al.*, 2001). Por outro lado, a administração intracerebroventricular (i.c.v.) de anticorpos contra TNF- $\alpha$  em ratos (REYNOLDS *et al.*, 2004) e o uso de medicamentos bloqueadores do TNF- $\alpha$  em humanos (KRISHNAN *et al.*, 2007), propiciam um efeito tipo antidepressivo.

Outros estudos (KENIS; MAES, 2002; NISHIDA *et al.*, 2002) mostram que alguns antidepressivos, tais como ISRS, tricíclicos e inibidores da monoamino oxidase (MAO) tem efeito anti-inflamatório. A terapia clássica com esses antidepressivos, por exemplo, diminuiu citocinas pró-inflamatórias (XIA; DEPIERRE; NÄSSBERGER, 1996; LANQUILLON *et al.*, 2000; TUGLU *et al.*, 2003) e/ou aumentou citocinas anti-inflamatórias (MAES *et al.*, 1999; KUBERA *et al.*, 2001). Corroborando com esses achados, em dois estudos realizados por Taler e colaboradores (TALER *et al.*, 2007, 2008) a administração de dois tipos de ISRS (sertralina e paroxetina) foi capaz de diminuir a secreção de TNF- $\alpha$  periféricamente e diminuir a atividade da ciclooxigenase (enzima envolvida no processo de inflamação), sugerindo que esses antidepressivos podem ter ação imunomoduladora, diminuindo a inflamação. Outro estudo mostrou que a desipramina, um antidepressivo da classe dos tricíclicos, impediu o efeito da administração de lipopolissacarídeo (LPS) bacteriano sobre a expressão de genes inflamatórios, como genes responsáveis pelo aumento de TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$ , além de diminuir a expressão da enzima óxido nítrico sintase induzível (iNOS) e a ativação do fator nuclear  $\kappa$ B (NF $\kappa$ B) no córtex de ratos (O'SULLIVAN *et al.*, 2009). A desipramina também foi capaz de diminuir o mRNA do TNF- $\alpha$  localizado em neurônios específicos de áreas cerebrais relacionadas com o humor (NICKOLA *et al.*, 2001). Vale ressaltar que a maioria dos antidepressivos possui alguma ação anti-inflamatória específica, a qual pode correlacionar-se com a eficácia terapêutica desses fármacos (MAES *et al.*, 2009).

As citocinas produzidas periféricamente podem atingir ou mandar sinais para o SNC através de 3 mecanismos principais: (1) ingresso no SNC através de regiões permeáveis da barreira hematoencefálica, como os órgãos circunventriculares, que são desprovidos de barreira hematoencefálica; (2) ligação em moléculas carreadoras de citocinas, que são expressas no endotélio cerebral; (3) transmissão de seus sinais até núcleos cerebrais específicos através da ativação de fibras aferentes

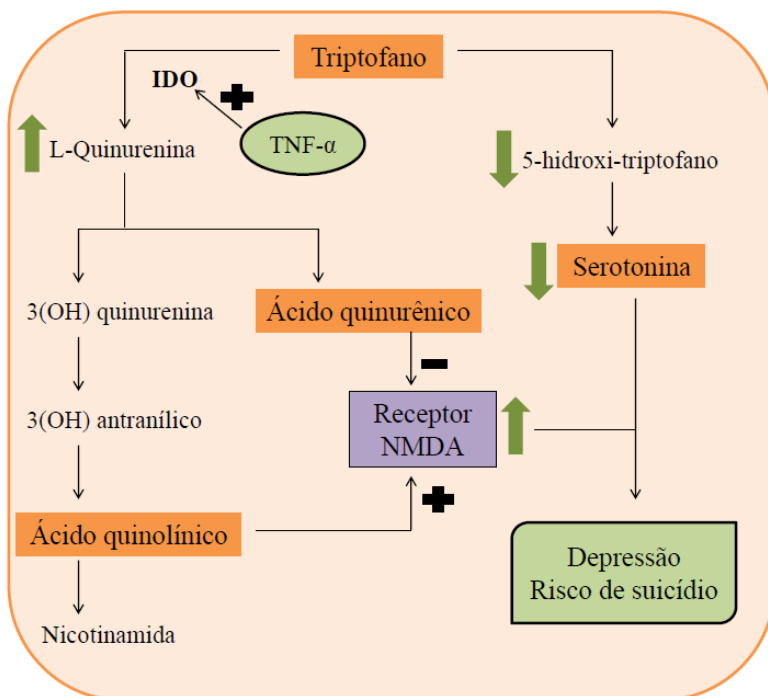
vagais (SCHIEPERS; WICHERS; MAES, 2005; RAISON; CAPURON; MILLER, 2006; KHAIROVA *et al.*, 2009).

De acordo com a hipótese inflamatória da depressão, quando uma inflamação periférica atinge o encéfalo, a microglia é a primeira célula a ser ativada e a responder a esse estímulo. A microglia ativada, por sua vez, inicia uma cascata inflamatória, conduzindo à liberação de citocinas, quimiocinas, mediadores inflamatórios, espécies reativas de oxigênio (ROS) e espécies reativas de nitrogênio (RNS), os quais irão induzir a ativação dos astrócitos, amplificando os sinais inflamatórios no SNC (MILLER; MALETIC; RAISON, 2009). Os elevados níveis de citocinas pró-inflamatórias (tais como TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ ) no encéfalo ou o estresse oxidativo ocasionado pelo excesso de ROS e RNS levarão a ativação da enzima indoleamina 2,3-dioxigenase (IDO), a qual converterá o triptofano em quinurenina, e, por consequência, diminuirá os níveis de serotonina, já que o triptofano é o precursor desse neurotransmissor (WICHERS; MAES, 2004; MCNALLY; BHAGWAGAR; HANNESTAD, 2008; LEONARD; MAES, 2012). No encéfalo, a conversão do triptofano em quinurenina ocorre principalmente nos astrócitos e na microglia, apesar de alguns neurônios também possuírem a enzima para a conversão. A quinurenina também pode vir da periferia (ex: fígado, pulmão, placenta, rins, baço), uma vez que pode ser gerada pela enzima triptofano 2,3-dioxigenase ou pela IDO, que convertem o triptofano em quinurenina (MYINT; SCHWARZ; MÜLLER, 2012). No encéfalo, a quinurenina pode ser convertida em ácido quinurênico nos astrócitos ou em ácido quinolínico na microglia. O ácido quinurênico pode inibir a liberação de glutamato e diminuir a liberação de dopamina, que como já mencionado, é um dos neurotransmissores envolvidos na fisiopatologia da depressão. Inversamente, o ácido quinolínico, que é um agonista do receptor NMDA, aumenta a liberação de glutamato, contribuindo para a excitotoxicidade glutamatérgica e para o estresse oxidativo (WICHERS; MAES, 2004; MCNALLY; BHAGWAGAR; HANNESTAD, 2008; LEONARD; MAES, 2012; MYINT; SCHWARZ; MÜLLER, 2012). Assim, o excesso de citocinas inflamatórias no encéfalo pode agravar a depressão.

Um estudo realizado com 31 pacientes controles e 30 pacientes com depressão (14 destes com história de tentativa de suicídio) demonstrou que o grupo de pacientes com histórico de tentativa de suicídio apresentou níveis aumentados de quinurenina quando comparado ao grupo de pacientes sem histórico de tentativa de suicídio, sugerindo que um aumento na ativação dos receptores NMDA,

associado com uma diminuição nos níveis de serotonina, pode predispor o indivíduo a um risco aumentado de tentativa de suicídio (SUBLETTE *et al.*, 2011).

A **Figura 1** mostra de forma simplificada a via do triptofano em condições inflamatórias.



**Figura 1 - Triptofano e inflamação: um estímulo para a via das quinureninas.** Na presença de citocinas inflamatórias, como o fator de necrose tumoral  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), ocorre um estímulo da enzima indoleamina 2,3-dioxigenase (IDO). Dessa forma, o triptofano diminui sua conversão para serotonina e passa a se transformar mais em L-quinurenina. A L-quinurenina pode se transformar em ácido quinurênico, um antagonista do receptor N-metil-D-aspartato (NMDA – um subtipo de receptor do glutamato) ou em ácido quinolínico, um agonista do receptor NMDA. A associação da diminuição da serotonina com um aumento da ativação dos receptores NMDA, pelo aumento de ácido quinolínico, pode predispor o indivíduo à depressão e a um maior risco de suicídio.

O excesso de citocinas inflamatórias também demonstra alterar o eixo HPA, levando ao aumento do hormônio liberador de corticotropina, do hormônio adrenocorticotrópico, dos níveis de cortisol e alterações na função dos receptores de glicocorticoides, modificações essas, que também são comuns em alguns pacientes com depressão (PARIANTE; MILLER, 2001; MILLER; MALETIC; RAISON, 2009; ANTONIOLI; RYBKA; CARVALHO, 2012; ZUNSZAIN; HEPGUL; PARIANTE, 2012). A inflamação também leva à resistência ao glicocorticoide, impedindo que esses exerçam sua ação anti-inflamatória, o que contribui ainda mais para as mudanças no eixo HPA (ZUNSZAIN; HEPGUL; PARIANTE, 2012).

Num estudo recente, após a avaliação da expressão de mRNA (em células sanguíneas periféricas de pacientes com depressão) de quatro genes envolvidos na inflamação, estresse oxidativo e nitrosativo, concluiu-se que as vias de inflamação e estresse oxidativo e nitrosativo estão envolvidos na fisiopatologia da depressão (GAŁECKI *et al.*, 2012). Apesar de vários estudos correlacionando a inflamação com depressão, não está claro se a depressão provoca alterações na resposta a inflamação ou se a inflamação é um fator de risco para o surgimento de transtornos depressivos (MILLER; MALETIC; RAISON, 2009). Embora alguns estudos mostrem que fármacos com ação anti-inflamatória não apresentam um efeito tipo antidepressivo (DEAK *et al.*, 2005), algumas substâncias ou alimentos com propriedade anti-inflamatória apresentam efeitos tipo antidepressivo em modelos animais de depressão, como ácidos graxos ômega-3 (VENNA *et al.*, 2009), curcumina (KULKARNI; BHUTANI; BISHNOI, 2008), N-acetilcisteína (FERREIRA *et al.*, 2008), cacau (MESSAOUDI *et al.*, 2008), romã (MORI-OKAMOTO *et al.*, 2004), entre outros. Além disso, alguns estudos mostraram que drogas antidepressivas como a cetamina (CHANG *et al.*, 2009; LOIX; DE KOCK; HENIN, 2011), a fluoxetina e o citalopram (ABDEL-SALAM; BAIUOMY; ARBID, 2004; SACRE *et al.*, 2010) apresentaram efeito anti-inflamatório.

### **1.1.3 Relação da depressão com a neurogênese e a morte celular**

As hipóteses prévias que tentavam explicar as causas e os mecanismos envolvidos com o tratamento para a depressão se baseavam nos efeitos agudos dos antidepressivos. Entretanto, com as observações clínicas de que a resposta terapêutica só ocorre algumas semanas após o início do tratamento, percebeu-se que adaptações na ação aguda dos antidepressivos também são necessárias para a sua ação. Exemplos

dessas adaptações são: regulação da transcrição de genes, regulação das cascatas de sinalização e dos receptores de neurotransmissores, além de alterações na morfologia e número de neurônios. Com base nisso, hoje já se discute sobre o papel da neurogênese e neurodegeneração na etiologia e tratamento da depressão (DUMAN, 2004; FUCHS *et al.*, 2004).

Embora alguns trabalhos não tenham mostrado alteração no volume hipocampal de pacientes com depressão, (VAKILI *et al.*, 2000; POSENER *et al.*, 2003), vários outros estudos evidenciaram modificações no volume hipocampal de pacientes com esse distúrbio psiquiátrico, sugerindo a ocorrência de alterações na neurogênese (MACQUEEN *et al.*, 2003; SHELIN; GADO; KRAEMER, 2003; SAHAY; HEN, 2007; COLE *et al.*, 2010; MALYKHIN *et al.*, 2010). Cole e colaboradores (2010) demonstraram que pacientes com depressão recorrente tinham uma diminuição no volume hipocampal quando comparado com indivíduos controle e que pacientes com o primeiro episódio de depressão tinham apenas o hipocampo direito com volume diminuído. Em outro estudo realizado por Malykhin *et al.* (2010) foi evidenciado uma redução no volume hipocampal em pacientes com depressão, o qual foi reestabelecido pelo tratamento com antidepressivos, quando comparado com pacientes controles e com pacientes com depressão não medicados. Corroborando com esses dados, alguns estudos já demonstraram que a administração crônica de diversas classes de antidepressivos, como ISRS, inibidores seletivos da recaptação de noradrenalina e inibidores da MAO, são capazes de aumentar a neurogênese (MALBERG *et al.*, 2000; MALBERG, 2004; PERERA *et al.*, 2007; ANACKER *et al.*, 2011) e que os efeitos comportamentais dos antidepressivos podem ser mediados por estímulo da neurogênese no hipocampo (SANTARELLI *et al.*, 2003; SAMUELS; HEN, 2011).

Além de uma alteração na neurogênese, a perda do volume hipocampal vista em pacientes com depressão também pode ser devida a uma maior morte de neurônios, já que o hipocampo é uma das regiões cerebrais mais vulneráveis a perda desse tipo de célula (SAPOLSKY, 2000). Como revisado por Hurley e Tizabi (2012), processos neurodegenerativos, que são acompanhados de perda ou atrofia de neurônios e de células da glia, são fatores importantes que contribuem para os distúrbios de humor.

A inflamação que, como já mencionado, está relacionada com a depressão, pode influenciar a funcionalidade neuronal principalmente pelo fato de que citocinas inflamatórias como TNF- $\alpha$  e IFN- $\gamma$



conseguirem alterar processos metabólicos, estresse oxidativo, excitotoxicidade e apoptose (HAYLEY *et al.*, 2005). Trabalhos com o TNF- $\alpha$ , citocina utilizada no presente trabalho, bem como com a IL-1, já mostraram que essas moléculas são capazes de exacerbar a morte celular, prejudicar a neurogênese e levar a neurodegeneração (VIVIANI *et al.*, 2004; PATEL *et al.*, 2006). O estresse oxidativo, que pode ser ocasionado ou intensificado pela inflamação, leva, dentre outros problemas, a danos em lipídeos, proteínas e DNA, contribuindo para a morte celular (MAES *et al.*, 2011). Além disso, uma desregulação no eixo HPA, comum em cerca de 50% os pacientes com depressão e que também pode ser intensificada pela inflamação, leva a uma sustentada elevação dos glicocorticoides que, por sua vez, acarreta em uma diminuição da neurogênese no hipocampo (SAPOLSKY, 2000; DUMAN, 2004). O excesso de glicocorticoides também pode causar efeitos tóxicos para os neurônios, principalmente por aumentar o cálcio livre no citoplasma e aumentar a quantidade de glutamato extracelular na presença de algum insulto, contribuindo para a morte neuronal (LEE; OGLE; SAPOLSKY, 2002).

Vários mecanismos, neurotransmissores, mensageiros celulares e proteínas estão envolvidos com o processo de morte celular (SAPOLSKY, 2000; LEE; OGLE; SAPOLSKY, 2002; HARA; SNYDER, 2007). A família Bcl2 é um conjunto de proteínas que auxiliam na regulação da morte celular induzida por apoptose, já que elas integram sinais de morte e sobrevivência celular gerados dentro ou fora da célula (BORNER, 2003). Nos mamíferos, a família da Bcl2 consiste em pelo menos 30 proteínas que se diferenciam em menos de 20 resíduos de aminoácidos no domínio de homologia à Bcl2 (BH) (TZIFI *et al.*, 2012). A família Bcl2 é dividida em duas classes: membros pró-apoptóticos, como a Bax e Bak e membros antiapoptóticos como a Bcl2 e Bcl-xL (ANTONSSON, 2001; BORNER, 2003). Estudos mais recentes (TZIFI *et al.*, 2012) mencionam uma terceira classe que é constituída de membros pró-apoptóticos que possuem apenas o domínio BH3 em comum, tais como Bad e Bid.

De maneira simplificada, pode-se dizer que a ativação da Bax ou da Bak permite que o citocromo c seja liberado da mitocôndria para o citosol da célula; no citosol, o citocromo c se liga a proteínas adaptadoras, como a Apaf-1, que irão ativar as pró-caspases em caspases, que induzirão a apoptose (ANTONSSON, 2001; TZIFI *et al.*, 2012). Outros membros da família Bcl2, como a própria Bcl2, impede a ativação da Bax e, por consequência, previne a ativação das caspases e a apoptose (MURPHY *et al.*, 2000; TZIFI *et al.*, 2012). Embora esse seja

o mecanismo mais comentado, sabe-se que os membros da família Bcl2 podem agir de diversas formas na regulação da morte celular: a) formação de poros na mitocôndria, permitindo a liberação do citocromo c; b) heterodimezização entre membros pró- e antiapoptóticos da família Bcl2; c) regulação direta de caspases via moléculas adaptadoras; d) interação com outras proteínas da mitocôndria, que interferem ou na saída de citocromo c ou na homeostase mitocondrial; e) oligomerização para formar canais iônicos fracamente seletivos (HENGARTNER, 2000; TZIFI *et al.*, 2012).

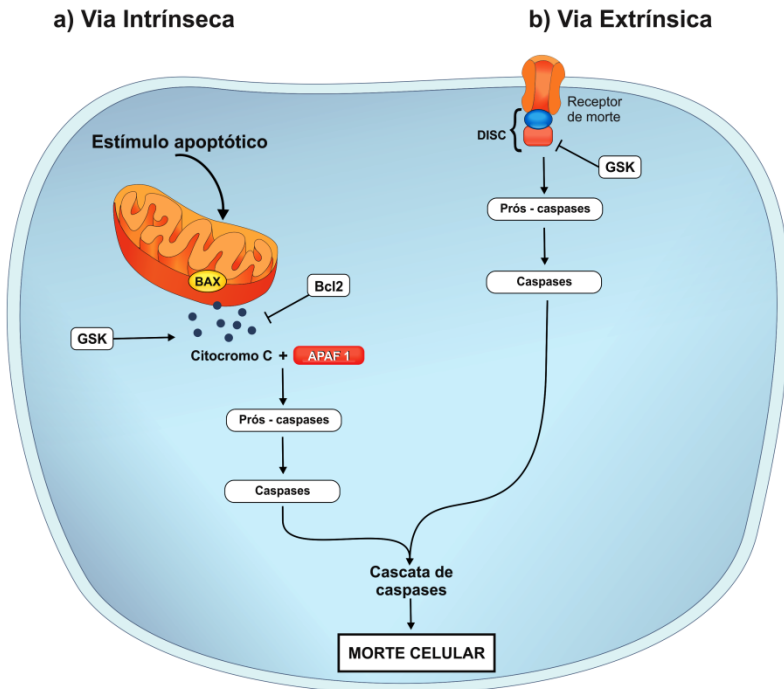
A Bax está presente principalmente no citosol e no retículo endoplasmático da célula, enquanto que a Bcl2 está presente na membrana externa da mitocôndria, no envelope nuclear e no retículo endoplasmático. Essas proteínas também estão implicadas no controle da liberação de cálcio pelo retículo endoplasmático, fator esse que também contribui para a apoptose (TZIFI *et al.*, 2012). Vale ressaltar que, devido ao seu papel na apoptose, as proteínas da família Bcl2 tem sido estudada em vários tipos de câncer, em situações em que ocorre a atrofia de tecidos, em doenças neurodegenerativas, na depressão, entre outras doenças (COLITTI; STRADAIOLI; STEFANON, 2000; MATTSON, 2000; KUBERA *et al.*, 2011; TZIFI *et al.*, 2012).

A enzima glicogênio sintase cinase-3 (GSK-3) também mostra envolvimento na apoptose (GRIMES; JOPE, 2001; JOPE; JOHNSON, 2004; GÓMEZ-SINTES *et al.*, 2011). Inicialmente, a GSK-3 foi identificada como uma enzima que participa do metabolismo do glicogênio (COHEN, 1979). Entretanto, hoje já se tem conhecimento que essa enzima é importante para a regulação de vários processos celulares, entre eles arquitetura, função e sobrevivência celular e que uma desregulação dessa enzima pode influenciar várias doenças, como por exemplo, diabetes, resistência à insulina, câncer, esquizofrenia, Alzheimer, depressão, entre outras (BEAULIEU; GAINETDINOV; CARON, 2009; GÓMEZ-SINTES *et al.*, 2011).

Existem duas isoformas da GSK-3 ( $\alpha$  e  $\beta$ ). Essas isoformas são estruturalmente similares, mas funcionalmente diferentes. GSK-3 é ativada por fosforilação em resíduos de tirosina e inativada por fosforilação em resíduos de serina, sendo que várias proteínas cinases diferentes podem estar envolvidas na fosforilação da GSK-3, incluindo proteína cinase B (Akt), proteína cinase A (PKA), proteína cinase C (PKC), entre outras (JOPE; JOHNSON, 2004; CORTÉS-VIEYRA *et al.*, 2012). Dentre as funções da GSK-3, destaca-se, no presente trabalho, sua função na apoptose. A GSK-3 pode ter dois efeitos opostos na apoptose: quando a apoptose é mediada pela via intrínseca

(relacionada com a família Bcl2 e liberação de citocromo c), a GSK-3 age como pró-apoptótica, ou seja, ela estimula a apoptose principalmente por interagir com proteínas como a Bax e estimular a desintegração da mitocôndria com maior liberação de citocromo c. Já quando a apoptose é mediada pela via extrínseca (relacionada com ativação de receptores de morte, formação do complexo de sinalização indutor de morte e subsequente ativação de caspase), a GSK-3 age como antiapoptótica, evitando a morte celular (LINSEMAN *et al.*, 2004; BEUREL; JOPE, 2006; GÓMEZ-SINTES *et al.*, 2011).

A **Figura 2** mostra de maneira resumida o envolvimento das proteínas Bax, Bcl2 e GSK-3 na apoptose.



**Figura 2 – Envolvimento da Bax, Bcl2 e GSK-3 na apoptose.** A apoptose pode ser mediada pela via intrínseca ou extrínseca: a) Na via intrínseca, após um estímulo intracelular, a ativação da proteína Bax leva a liberação de citocromo c da mitocôndria para o citoplasma, que por sua vez se liga a proteína adaptadora APAF1, ativando pró-caspases em caspases, que levarão a morte celular. Nessa via, a Bcl2 impede a liberação de citocromo c, principalmente por interagir com a BAX, desempenhando um papel antiapoptótico; já a glicogênio sintase cinase 3 (GSK-3) leva a um aumento na liberação de citocromo c por estimular a desintegração da mitocôndria, desempenhando um papel pró-apoptótico. b) Na via extrínseca, após a ativação do receptor de morte, que pode ser ativado pelo fator de necrose tumoral (TNF) por exemplo, ocorre a formação do complexo de sinalização indutor de morte (DISC), que levará a ativação de pró-caspase em caspases, ocasionando a morte celular. Nessa via, a GSK-3 age bloqueando a formação do DISC, desempenhando um papel antiapoptótico.

A GSK-3 $\beta$  é ativada pela fosforilação no resíduo tirosina 216 e inativada pela fosforilação no resíduo serina 9 (JOPE; JOHNSON, 2004). Além de estar envolvida na apoptose, a GSK-3 $\beta$  também é importante na regulação da resposta inflamatória. Semelhante ao que ocorre na apoptose, a GSK-3 $\beta$  também desempenha um papel dual na inflamação, sendo que a ativação ou inativação da GSK-3 $\beta$  pode modular a atividade do NF- $\kappa$ B, promovendo ou inibindo a resposta inflamatória. A hipótese que se postula é que o efeito que a GSK-3 $\beta$  desempenhará irá depender do fator que desencadeou o processo inflamatório, da célula envolvida e possivelmente do estado fisiológico da célula (GRAHAM; TULLAI; COOPER, 2010; CORTÉS-VIEYRA *et al.*, 2012).

Adicionalmente, alguns estudos mostraram associação entre GSK-3 $\beta$  e modelos animais de depressão, sendo que a inibição dessa proteína estava associada, pelo menos em parte, com a ação terapêutica de antidepressivos (GOULD *et al.*, 2004; LI *et al.*, 2004; BEAULIEU *et al.*, 2008). Além disso, como revisado por Beaulieu, Gainetdinov e Caron (2009), a via de sinalização da GSK-3 $\beta$  pode ser modulada por alterações na homeostase de monoaminas como a serotonina e a dopamina. Um fato interessante é que a atividade da GSK-3 $\beta$  parece ser dependente da idade, já que existe estudo mostrando que a atividade da GSK-3 $\beta$  no córtex pré-frontal estava aumentada (KAREGE *et al.*, 2007) ou inalterada (PANDEY *et al.*, 2009) em pacientes adultos vítimas de suicídio, enquanto que em adolescentes que cometeram suicídio ocorreu uma diminuição na atividade da GSK-3 $\beta$  no córtex pré-frontal (PANDEY *et al.*, 2009).

Além das proteínas já mencionadas, neurotransmissores também desempenham um papel importante na apoptose ou sobrevivência neuronal (SAPOLSKY, 2000). O principal neurotransmissor envolvido com a morte celular é o glutamato, que, ao se ligar aos receptor NMDA, permite o influxo de cálcio para dentro do neurônio, além de ativar a nNOS (HARA; SNYDER, 2007). Essas duas consequências fazem com que o excesso de glutamato na fenda sináptica, característica essa que pode estar presente em pacientes depressivos com inflamação, possa levar a morte neuronal por diversos fatores:

a) O aumento do NO inibe uma enzima presente na mitocôndria, chamada de citocromo c oxidase, o que levará a uma diminuição na produção de ATP podendo, desta forma, levar a morte celular (MONCADA; ERUSALIMSKY, 2002).

b) O NO pode reagir com o ânion superóxido, formando peroxinitrito, que pode causar danos no DNA, superativar a poli ADP –

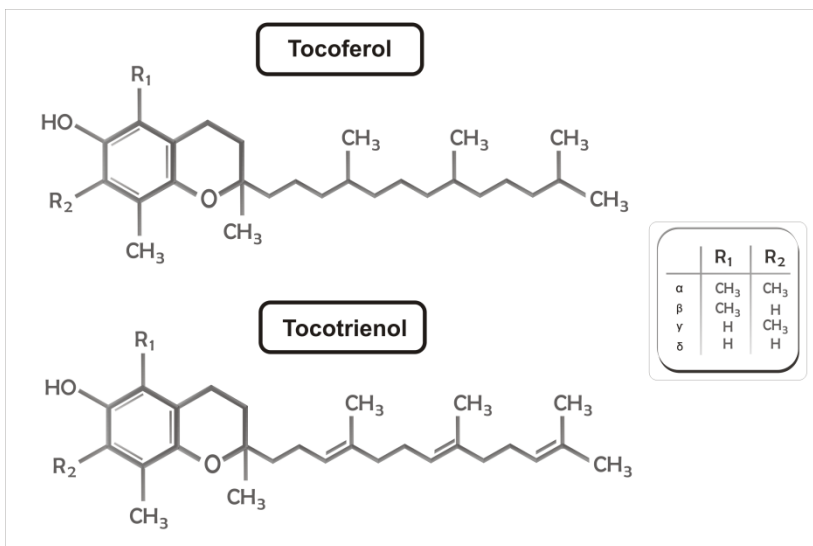
ribose polimerase, depletar  $\text{NAD}^+$  e causar morte neuronal (JAGTAP; SZABÓ, 2005).

c) NO pode nitrosilar algumas proteínas, como por exemplo, a metaloproteinase-9, que levará a apoptose neuronal (GU *et al.*, 2002).

d) O aumento de cálcio intracelular pode estimular a morte celular por diversas maneiras diferentes, como por exemplo: através da liberação de citocromo c da mitocôndria para o citosol, com consequente ativação de caspase; e através da ativação de calpains, que são proteases estimuladas por cálcio que, dentre suas funções, destaca-se a clivagem de proteínas antiapoptóticas como a Bcl2 (RIEDL; SHI, 2004; VANDENABEELE; ORRENIUS; ZHIVOTOVSKY, 2005).

## 1.2 VITAMINA E

A vitamina E é uma vitamina lipossolúvel, essencial para os seres humanos e que foi descoberta em 1922, sendo, nesta época, denominada de “fator X”, apresentando função importante na reprodução de ratos (EVANS; BISHOP, 1922). Posteriormente, esse “fator X” passou a se chamar vitamina E e hoje já se sabe que oito análogos quimicamente diferentes dessa vitamina estão presentes nos alimentos: alfa ( $\alpha$ ), beta ( $\beta$ ), gama ( $\gamma$ ) e delta ( $\delta$ )-tocoferol e  $\alpha$ -,  $\beta$ -,  $\gamma$ - e  $\delta$ -tocotrienol (TRABER, 2007). Tocoferóis e tocotrienóis têm uma estrutura similar: um anel cromanol hidrofílico e uma cadeia lateral de isoprenóide. A diferença entre eles é que o tocoferol tem uma cadeia saturada, enquanto que o tocotrienol tem uma cadeia insaturada. As diferenças entre os análogos  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ , e  $\delta$  são o número e a localização dos grupos metil nos anéis cromanol (BRIGELIUS-FLOHÉ; TRABER, 1999; SCHNEIDER, 2005), como mostrado na **Figura 3**.



**Figura 3 - Estrutura química da vitamina E**

Entre os oito análogos de vitamina E, o  $\alpha$ -tocoferol é o mais abundante nos alimentos. Entre os alimentos fontes de vitamina E, destacam-se: óleos vegetais, amêndoas, amendoim, semente de girassol, cereais matinais enriquecidos com vitamina E, ovo, e algumas frutas e legumes (MURPHY; SUBAR; BLOCK, 1990; BRAMLEY *et al.*, 2000; SAREMI; ARORA, 2010). A recomendação diária da ingestão de vitamina E para um adulto saudável é de 15 mg (NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES. INSTITUTE OF MEDICINE. FOOD AND NUTRITION BOARD, 2010) e, embora as suplementações sejam realizadas com dosagens maiores, a toxicidade da vitamina E é muito baixa (TRABER, 2007).

Ao ser ingerida, a vitamina E passa inalterada pelo estômago. Por ser uma substância lipossolúvel, a absorção intestinal dessa vitamina depende de sais biliares e da secreção pancreática (GALLO-TORRES, 1970). Assim, as micelas são formadas e podem ser absorvidas, principalmente no início do intestino delgado, por um processo passivo e, pelo menos em parte, pelo receptor *scavenger* classe B tipo I (SR-BI), que é uma glicoproteína transmembrana que medeia a absorção seletiva de ésteres de colesterol associada às lipoproteínas de alta densidade (HDL) (TRABER; SIES, 1996; REBOUL *et al.*, 2006; LEMAIRE-EWING *et al.*, 2010). Dentro dos enterócitos, a vitamina E é esterificada e, em seguida, incorporada nos quilomicrons. Os quilomicrons circulam

através dos vasos linfáticos e rapidamente atingem os vasos sanguíneos. Neste momento, a enzima lipase lipoproteica (LPL) hidrolisa os triacilgliceróis presentes na superfície do quilomicron e, durante esse processo, parte da vitamina E é transferida para as HDL, enquanto que a vitamina E que não foi transferida permanece no quilomicron remanescente. Quando os quilomicrons remanescentes chegam ao fígado, a proteína de transferência de  $\alpha$ -tocoferol ( $\alpha$ -TTP) liga-se ao  $\alpha$ -tocoferol, separando-o do quilomicron remanescente e, em seguida, o  $\alpha$ -tocoferol é empacotado junto com as apolipoproteínas e triacilgliceróis nas lipoproteínas de muito baixa densidade (VLDL) (BRAMLEY *et al.*, 2000; SCHNEIDER, 2005; LEMAIRE-EWING *et al.*, 2010). A  $\alpha$ -TTP hepática tem uma alta seletividade para o  $\alpha$ -tocoferol e, por consequência, o  $\alpha$ -tocoferol é o principal isômero da vitamina E encontrado no plasma e nos tecidos (LEMAIRE-EWING *et al.*, 2010).

Após sua formação, as VLDLII são transportadas através da corrente sanguínea, onde sofrem a ação de LPL no endotélio celular periférico e se transformam em outras partículas de lipoproteínas (lipoproteína de baixa densidade (LDL), HDL e VLDL remanescentes). Assim,  $\alpha$ -tocoferol pode retornar para o fígado ou ser entregue a células-alvo (BRAMLEY *et al.*, 2000; SCHNEIDER, 2005; LEMAIRE-EWING *et al.*, 2010). A  $\alpha$ -TTP além de estar presente no fígado, também pode ser encontrada em células da barreira hematoencefálica, retina, linfócitos, fibroblastos e placenta, onde o  $\alpha$ -tocoferol é absorvido de maneira facilitada pelas células (BRIGELIUS-FLOHÉ; TRABER, 1999). Além disso, SR-BI, proteínas associadas ao tocoferol e a proteína de transferência de fosfolípido também são importantes para a correta distribuição de vitamina E pelos tecidos (LEMAIRE-EWING *et al.*, 2010).

Para conseguir atravessar a barreira hematoencefálica e assim, atingir o SNC, o  $\alpha$ -tocoferol precisa estar empacotado dentro da LDL ou HDL (RICCIARELLI; ZINGG; AZZI, 2001). Goti *et al.* (2000) mostraram que a HDL é melhor doadora de  $\alpha$ -tocoferol para o SNC do que a LDL, sendo que a absorção parece ser dependente de SR-BI. Além disso, como revisado por Muller (2010), tecidos neurais preferencialmente conservam a vitamina E, o que sugere uma taxa de turnover diminuída quando comparada com outros tecidos.

Com base nesses mecanismos de absorção e distribuição da vitamina E pelos tecidos, conclui-se que alterações nas lipoproteínas ou na  $\alpha$ -TTP podem alterar a homeostase de vitamina E e sua absorção pelos tecidos. Por exemplo, os indivíduos que não têm uma  $\alpha$ -TTP funcional sofrem de uma doença neurodegenerativa com isolada



deficiência de vitamina E (GOTODA *et al.*, 1995) e camundongos com deleção na  $\alpha$ -TTP tem, em várias regiões do encéfalo, concentrações reduzidas de  $\alpha$ -tocoferol (GOHIL *et al.*, 2008).

### 1.2.1 Funções da vitamina E

A vitamina E tem várias funções para os seres humanos, incluindo ações antioxidante, anti-inflamatória, antitumoral e antiaterogênica, efeitos diretos sobre atividades enzimáticas e regulação na transcrição de alguns genes (SCHNEIDER, 2005; TUCKER; TOWNSEND, 2005; SAREMI; ARORA, 2010).

Numerosos estudos têm avaliado o papel antioxidante da vitamina E. Essa vitamina atua como um antioxidante de membrana, evitando a oxidação de ácidos graxos poli-insaturados (PUFA) nas membranas celulares e lipoproteínas (BRIGELIUS-FLOHÉ; TRABER, 1999; HERRERA; BARBAS, 2001; TRABER, 2007). Em humanos, a suplementação com 400 mg/dia de vitamina E durante 3 meses em pacientes com diabetes mellitus tipo 2, utilizando hipoglicemiantes, reduziu o estresse oxidativo, demonstrado pela diminuição nos níveis de malondialdeído e NO e aumento da atividade de defesas antioxidantes (superóxido dismutase e glutathione reduzida) quando comparado com o grupo de pacientes com diabetes mellitus tipo 2 utilizando apenas medicamentos hipoglicemiantes (sem adição de vitamina E) (SHINDE; DHADKE; SURYAKAR, 2011). Em outro estudo, a suplementação com 150 mg/dia de vitamina C e 200 UI/dia de vitamina E durante quatro semanas em mulheres que utilizavam contraceptivos orais aumentou a atividade da glutathione peroxidase e glutathione reductase e reduziu os níveis plasmáticos de malondialdeído, sugerindo que a suplementação com essas duas vitaminas reduziu o estresse oxidativo e a peroxidação lipídica causada pelo uso de contraceptivos orais (ZAL *et al.*, 2012).

Além do papel antioxidante da vitamina E, alguns estudos apontam que essa vitamina também tem propriedades anti-inflamatórias. Um estudo com hiperplasia mamária mostrou que uma mistura contendo 58% de  $\gamma$ -tocoferol suprimiu marcadores inflamatórios (SMOLAREK *et al.*, 2012). Outro estudo mostrou que os tocotrienóis suprimiram marcadores pró-inflamatórios e a expressão da ciclooxigenase-2 em macrófagos, mas o  $\alpha$ -tocoferol não proporcionou o mesmo efeito (YAM *et al.*, 2009).

Em animais tratados com LPS, demonstrou-se que a injeção de 20 mg de  $\alpha$ -tocoferol durante 3 dias atenuou a ativação do NFkB, diminuiu

a peroxidação lipídica e a produção de citocinas pró-inflamatórias (IL-6 e IL-1 $\beta$ ) no encéfalo de camundongos (GODBOUT *et al.*, 2004; GODBOUT *et al.*, 2005). Já em seres humanos, um estudo mostrou que doses de 1200 UI/dia de  $\alpha$ -tocoferol durante 3 meses diminuiu os níveis de PCR e IL-6 em pacientes com diabetes mellitus tipo II (com ou sem doença macrovascular) e em indivíduos controle, demonstrando que a suplementação com  $\alpha$ -tocoferol reduziu a inflamação desses indivíduos (DEVARAJ; JIALAL, 2000).

Tem sido proposto que a ação anti-inflamatória da vitamina E é devido à modulação nas vias de sinalização envolvidas na transcrição de genes inflamatórios. Um exemplo disso é que o  $\alpha$ -tocoferol, ao ativar a proteína fosfatase 2A, leva a uma inibição da fosforilação da PKC, que é uma das vias que levaria a ativação do NF $\kappa$ B. Além disso, a vitamina E pode exercer a sua função anti-inflamatória por evitar a ativação de enzimas como a ciclooxigenase-2 e a 5-lipooxigenase, que estão envolvidas na biossíntese de eicosanoides pró-inflamatórios (MUNTEANU; ZINGG; AZZI, 2004; SINGH; DEVARAJ; JIALAL, 2005; REITER; JIANG; CHRISTEN, 2007; WU; MEYDANI, 2008).

Há relatos de que a vitamina E também pode alterar apoptose. Quando administrado em dose baixa, o  $\alpha$ -tocotrienol preveniu, *in vitro*, a morte celular induzida por glutamato (administrado 1 hora antes do  $\alpha$ -tocotrienol) em neurônios hipocâmpais do tipo HT4, enquanto que em dose mais elevada, o  $\alpha$ -tocotrienol evitou a morte celular mesmo quando administrada 6 horas após o insulto com glutamato, sugerindo que doses mais baixas de  $\alpha$ -tocotrienol agem em eventos mais precoces enquanto que doses mais altas aparentemente regulam eventos mais tardios (SEN *et al.*, 2000). Outros estudos *in vitro* mostraram que o  $\alpha$ -tocoferol também preveniu a morte celular induzida por glutamato tanto em neurônios HT4 (KOBAYASHI; HAN; PACKER, 2000; TIROSH *et al.*, 2000), quanto em neurônio corticais (SCHUBERT; PIASECKI, 2001). Corroborando com esses dados, um recente trabalho (ZAKHAROVA *et al.*, 2012) mostrou que o  $\alpha$ -tocoferol evitou a morte celular de neurônios PC12 induzida por peróxido de hidrogênio, além de ter modulado proteínas cinases como a Akt, cinase regulada por sinal extracelular (ERK) e PKC.

### 1.2.2 Vitamina E no SNC

No SNC, análogos da vitamina E estão presentes tanto no líquido cefalorraquidiano quanto no espaço extraencefálico. Em humanos, estima-se que a concentração no líquido cefalorraquidiano de  $\alpha$ -

tocoferol seja de  $42,1 \pm 17,0$  nM, enquanto que a concentração de outros análogos da vitamina E sejam mais baixas. A concentração de  $\gamma$ -tocoferol, por exemplo, é de  $5,9 \pm 2,8$  nM (VATASSERY *et al.*, 2004).

Além das funções já comentadas, a vitamina E também é importante para a função do SNC. Alguns estudos mostram uma associação entre a vitamina E, função cognitiva e ansiedade: a) Ortega *et al.* (2002) mostraram uma relação entre o status da vitamina E e função cognitiva em indivíduos idosos; b) Takatsu e colaboradores (2009) demonstraram que a suplementação de vitamina E em ratos idosos melhorou a memória; c) injeção intraperitoneal de vitamina E por sete dias melhorou a aprendizagem em ratos diabéticos (COMIN *et al.*, 2010); d) deficiência na proteína de transferência de fosfolípido reduziu os níveis de vitamina E no encéfalo e aumentou a ansiedade em camundongos (DESRUMAUX *et al.*, 2005); e) o tratamento prolongado com vitamina E e/ou vitamina C diminuiu a ansiedade em ratos (HUGHES; LOWTHER; VAN NOBELEN, 2011). No entanto, outros estudos não mostram uma ligação entre a vitamina E e função cognitiva em seres humanos (KANG *et al.*, 2006; DUNN *et al.*, 2007; SUN; ALKON, 2008; DINIZ *et al.*, 2009; CETIN *et al.*, 2010).

Além disso, há estudos que demonstram que a suplementação de vitamina E reduz os níveis e a deposição de beta amiloide em camundongos (SUNG *et al.*, 2004) e que a deficiência de vitamina E por nove meses afeta a expressão de genes envolvidos na depuração de beta amiloide em ratos (ROTA *et al.*, 2005). Em seres humanos, apesar de Petersen e colaboradores (2005) demonstrarem que a suplementação com vitamina E não foi benéfica nos pacientes com comprometimento cognitivo leve, outro estudo (MANGIALASCHE *et al.*, 2010) mostrou que os níveis aumentados de vitamina E reduziram o risco de desenvolver doença de Alzheimer.

Em relação à doença de Parkinson, embora alguns estudos não tenham mostrado alteração nos níveis séricos ou no líquido cefalorraquidiano de vitamina E em pacientes com essa doença (FÉRNANDEZ-CALLE *et al.*, 1992; KING; PLAYFER; ROBERTS, 1992; MOLINA *et al.*, 1997; NICOLETTI *et al.*, 2001), estudo mais recente evidenciou que esta vitamina teve um efeito protetor sobre os neurônios do locus coeruleus em um modelo de estágio inicial da doença de Parkinson (PASBAKSH *et al.*, 2008). Além disso, em uma meta-análise (ETMINAN; GILL; SAMII, 2005), os autores concluíram que a vitamina E pode exercer um efeito neuroprotetor, atenuando o risco de doença de Parkinson.

### 1.3 VITAMINA E e DEPRESSÃO

Estudos têm demonstrado que, em ratos, a deficiência de vitamina E pode alterar o metabolismo de monoaminas. Ratos alimentados com dieta deficiente de vitamina E, por exemplo, apresentaram níveis diminuídos de serotonina e de ácido 5-hidroxi-indolacético (um dos principais metabólitos da serotonina) no córtex pré-frontal. Entretanto, esses mesmos animais apresentaram níveis aumentados de dopamina (CASTAÑO *et al.*, 1992). Outro estudo demonstrou que a deficiência dietética de vitamina E por três semanas reduziu o conteúdo de triptofano no córtex frontal de ratos, embora uma deficiência mais prolongada (por 12 semanas) não tenha alterado o sistema serotoninérgico (HESLOP *et al.*, 1996).

Além disso, existem alguns estudos pré-clínicos e clínicos que investigam a relação entre vitamina E e depressão.

#### 1.3.1 Estudos pré-clínicos

O potencial antidepressivo do  $\alpha$ -tocoferol foi investigado por Lobato e colaboradores (2010) em dois testes preditivos de atividade antidepressiva: o teste de nado forçado (TNF) e o teste de suspensão pela cauda (TSC). A administração oral (p.o.) de  $\alpha$ -tocoferol (nas doses de 30 e 100 mg/kg e a administração intracerebroventricular (i.c.v.) de  $\alpha$ -tocoferol fosfato (0,1 nmol/sítio), um análogo hidrossolúvel do  $\alpha$ -tocoferol, reduziram o tempo de imobilidade no TNF e TSC nos camundongos, sugerindo que esses análogos da vitamina E possuem ação tipo antidepressiva. Além disso, um tratamento crônico por 28 dias com 10 mg/kg de  $\alpha$ -tocoferol (p.o.) também reduziu o tempo de imobilidade no TNF, reforçando os achados anteriores.

Um estudo com ratos Wistar tratados durante quatro semanas com vitamina E (0,3 ml/dia, p.o.) mostrou que, no grupo de ratos tratados com essa vitamina, observou-se um efeito tipo antidepressivo, uma vez que esses animais apresentaram uma diminuição do tempo imobilidade no TNF (PARVEEN *et al.*, 2011).

#### 1.3.2 Estudos clínicos

Um estudo longitudinal (SHIBATA *et al.*, 1999) com a comunidade rural japonesa (com inquérito inicial em 1992 e acompanhamento até 1996) comparou a severidade da depressão (avaliada por uma versão curta do “Geriatric Depression Score” - GDS)

com os níveis séricos de colesterol total e  $\alpha$ -tocoferol de 504 idosos com 64 anos ou mais e concluiu que  $\alpha$ -tocoferol obteve efeito preventivo sobre a progressão do estado depressivo em idosos do sexo masculino.

Maes *et al.* (2000), após avaliar 36 voluntários saudáveis e 46 pacientes com depressão (diagnosticados DSM-III-R e a gravidade avaliada através de 17 itens da “Hamilton Depression Rating Scale” - HDRS) constataram que pacientes com depressão apresentaram menores níveis séricos de vitamina E, além da duração da depressão ter sido correlacionada positivamente com os níveis dessa vitamina. Além disso, o número de leucócitos e neutrófilos foi negativamente correlacionado e LDL foi positivamente correlacionada com os níveis de vitamina E em pacientes deprimidos. No entanto, nenhuma relação foi encontrada entre os níveis de vitamina E e os escores da HDRS e nem com a idade e sexo dos sujeitos.

Um estudo, com base no estudo de Rotterdam, selecionou aleatoriamente 459 indivíduos idosos sem depressão e 262 pacientes idosos deprimidos (avaliados pelo “Center for Epidemiologic Studies Depression” - CES-D). Comparado aos homens do grupo controle, os homens com depressão tinham níveis plasmáticos de vitamina E diminuídos após o ajuste para a idade. No entanto, após o ajuste para os níveis de colesterol, tabagismo e pontuação cognitiva, essa associação foi enfraquecida e, após ajuste para variáveis relacionadas ao comportamento nutricional, essa associação desapareceu. Em mulheres tal associação não foi observada. Além disso, quando os casos de depressão foram avaliados de acordo com o DSM-IV, não foram observadas diferenças (TIEMEIER *et al.*, 2002).

Em 2005, Owen e colaboradores após avaliarem 49 pacientes australianos com depressão (diagnosticados de acordo com a American Psychiatric Association) mostraram uma relação inversa entre  $\alpha$ -tocoferol plasmático e escores de depressão (mensurado pelo “Beck Depression Inventory” - BDI). Entretanto, não foi encontrada associação entre os níveis de  $\alpha$ -tocoferol e idade, sexo e uso de medicamentos antidepressivos por esses pacientes. Quando os autores compararam os níveis de  $\alpha$ -tocoferol em pacientes com depressão com os níveis encontrados em indivíduos australianos saudáveis, percebeu-se menores níveis de  $\alpha$ -tocoferol plasmático em pacientes deprimidos. Além disso, esse estudo avaliou a ingestão dietética de vitamina E (como equivalentes de  $\alpha$ -tocoferol) em 19 pacientes com depressão. O resultado foi que 17 dos 19 indivíduos consumiram vitamina E acima das recomendações diárias e que não houve correlação entre a ingestão dietética e os níveis de  $\alpha$ -tocoferol plasmático. Isto sugere que os níveis

reduzidos de  $\alpha$ -tocoferol em pacientes com depressão não são provavelmente devido à baixa ingestão dietética de vitamina E (OWEN *et al.*, 2005).

Tsuboi *et al.* (2006) avaliaram enfermeiras japonesas (18 com alto estresse no trabalho e 15 com baixo estresse no trabalho) e demonstraram que as enfermeiras com alto estresse no trabalho tinham sintomas depressivos mais severos (avaliado pela CES-D), e concentrações plasmáticas menores de colesterol total, LDL + VLDL,  $\alpha$ -tocoferol e  $\beta$ -caroteno quando comparado com as enfermeiras com estresse de trabalho baixo. No entanto, essas associações foram enfraquecidas após o controle de fatores de estilo de vida, com exceção de LDL + VLDL e  $\alpha$ -tocoferol. Além disso, os sintomas depressivos foram positivamente correlacionados com os níveis de malondialdeído em enfermeiras com baixo estresse no trabalho.

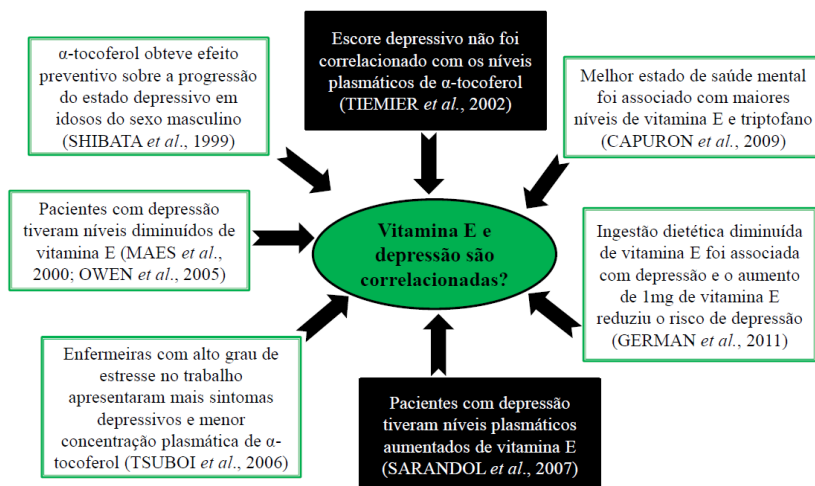
Em contraste com os resultados descritos anteriormente (MAES *et al.*, 2000; OWEN *et al.*, 2005), Sarandol *et al.* (2007) demonstraram que, comparados com controles saudáveis ( $n = 54$ ), pacientes depressivos ( $n = 96$ ) diagnosticados pelo DSM-IV apresentaram um aumento nos níveis de vitamina E no plasma.

Em 2009, outro estudo demonstrou associação entre depressão e vitamina E. Esse estudo, envolvendo 69 pacientes idosos (recrutados a partir de um estudo de coorte com 9294 idosos) mostrou que: a) os marcadores físicos e mentais de qualidade de vida (avaliados usando 36 itens do “Medical Outcomes Study” para a avaliação da saúde e um questionário de autopreenchimento que avalia os componentes físicos e mentais de qualidade de vida) obtiveram scores piores em indivíduos mais idosos; b) o nível de IL-6 foi inversamente correlacionado com a concentração plasmática de  $\alpha$ -tocoferol; c) mulheres apresentaram uma menor concentração de IL-6 e de triptofano e maior nível de vitamina E em comparação com os homens. O estado de saúde mental também foi associado com níveis de vitamina E e triptofano, indicando que quanto melhor o estado de saúde mental, maior eram os níveis de vitamina E e de triptofano. Portanto, os autores sugerem que a interação entre os níveis de vitamina E e vias inflamatórias pode influenciar a qualidade de vida em idosos (CAPURON *et al.*, 2009).

Finalmente, um estudo de 2011 com 112 idosos de Israel (60-92 anos) mostrou uma prevalência de depressão de 47% (avaliada com a versão curta de 15 itens da GDS). Após avaliar a ingestão dietética usando recordatório alimentar de 24 horas, uma diminuição da ingestão de vitaminas e minerais em pacientes idosos com e sem depressão foi observada. Além disso, a redução de PUFA e vitamina E foi associada

com a depressão, sendo que, um aumento de 1 g de PUFA e 1 mg de vitamina E reduziu o risco de depressão (GERMAN *et al.*, 2011).

A **Figura 4** resume os resultados encontrados em estudos clínicos que avaliaram a relação entre depressão e vitamina E.



**Figura 4 - Estudos clínicos que correlacionam vitamina E e depressão.**

#### 1.4 MODELOS ANIMAIS DE DEPRESSÃO

Os modelos animais são ferramentas que possibilitam uma melhor compreensão das bases neurológicas e de outros mecanismos envolvidos na depressão (CRYAN; MARKOU; LUCKI, 2002). Esses modelos auxiliam no desenvolvimento de hipóteses que relacionam bases biológicas com a depressão, além de contribuir para o entendimento das ações dos antidepressivos (MCARTHUR; BORSINI, 2006). Entretanto, pelo fato de que muitos dos sintomas principais da depressão, como humor deprimido e sentimento de culpa, são de difícil reprodução em animais de laboratório, ainda não existe um modelo animal de depressão totalmente validado e que abranja todas as características desse transtorno de humor (NESTLER *et al.*, 2002; CRYAN; SLATTERY, 2007).

Embora apresentem algumas limitações, os modelos com validade preditiva como o teste do nado forçado (TNF) e o teste de suspensão da cauda (TSC) são amplamente utilizados para pesquisar os

mecanismos neurais envolvidos na fisiopatologia da depressão, bem como para investigar o desenvolvimento de novos fármacos ou substâncias que poderia exercer atividade tipo antidepressiva (NESTLER *et al.*, 2002; MCARTHUR; BORSINI, 2006; NESTLER; HYMAN, 2010).

Porsolt, Bertin e Jalfre (1977) foram os primeiros pesquisadores que descreveram o TNF em ratos, que posteriormente foi utilizado para camundongos. Já o TSC foi descrito em camundongos por Steru *et al.* (1985). Esses dois modelos baseiam-se na observação do animal frente a uma situação inescapável. No momento inicial do teste, os animais se movimentam com mais frequência, na tentativa de escapar dessa situação que ele se encontra. Entretanto, após alguns minutos, os animais tendem a desenvolver uma postura mais imóvel, que consegue ser revertida após o tratamento agudo com antidepressivos clássicos utilizados na clínica. Além desses testes permitirem a busca por compostos com possível ação antidepressiva (BOURIN; MASSE; HASCOËT, 2005), eles são de fácil uso e de boa reprodutibilidade (CRYAN; MARKOU; LUCKI, 2002).

Além dos testes preditivos, modelos farmacológicos também são úteis para estudar a depressão, já que esses modelos, através de alterações neuroquímicas semelhantes àsquelas encontradas em pacientes com depressão, conseguem induzir a um comportamento tipo depressivo (MCARTHUR; BORSINI, 2006). Dentre esses modelos, destaca-se a administração de citocinas pró-inflamatórias como IL-1 $\beta$  (DUNN; SWIERGIEL, 2005), IL-6 (CHOURBAJI *et al.*, 2006), IFN- $\alpha$  (MAKINO *et al.*, 1998) e TNF- $\alpha$  (KASTER *et al.*, 2012).



## 2 JUSTIFICATIVA

A depressão é um dos transtornos de humor mais prevalente na sociedade, constituindo um grave problema de saúde pública (NEMEROFF; OWENS, 2002; EBMEIER; DONAGHEY; STEELE, 2006). Embora o tratamento atual para depressão seja normalmente seguro, ainda está longe do ideal, já que possui algumas limitações como: atraso na remissão dos sintomas, com uma latência entre o início do tratamento e a obtenção dos efeitos benéficos de algumas semanas (NEMEROFF; OWENS, 2002); grande número de respostas parciais ou ausência de respostas (RUHÉ *et al.*, 2011), com uma remissão completa dos sintomas depressivos após a terapia com antidepressivos em menos de 50% dos pacientes (BERTON; NESTLER, 2006); efeitos colaterais como dor de cabeça, náusea, ganho de peso, disfunção sexual, entre outros (BRUNELLO *et al.*, 2002; SERRETTI; MANDELLI, 2010). Dada a limitada eficácia das atuais opções terapêuticas, há uma necessidade de desenvolver novos agentes farmacológicos ou tirar vantagem de substâncias já existentes que poderiam melhorar a eficácia terapêutica e qualidade de vida dos pacientes.

Considerando as crescentes evidências de que a inflamação está envolvida na fisiopatologia de doenças psiquiátricas e do possível efeito tipo antidepressivo da vitamina E, este estudo pretende estender e/ou fornecer novos dados para o melhor entendimento da ação antidepressiva dessa vitamina, podendo contribuir para o futuro desenvolvimento de novas alternativas terapêuticas para o tratamento da depressão. Dessa forma, a hipótese do presente estudo é que a vitamina E evite o efeito tipo depressivo induzido por uma citocina inflamatória e que esse efeito pode estar correlacionado com o sistema monoaminérgico, receptores NMDA, enzima nNOS e com alterações em vias apoptóticas.



### 3 OBJETIVOS

#### 3.1 OBJETIVO GERAL

Investigar o efeito antidepressivo do  $\alpha$ -tocoferol em um modelo animal de comportamento depressivo induzido pelo TNF- $\alpha$ .

#### 3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Analisar se a administração de diferentes doses de  $\alpha$ -tocoferol revertem o comportamento tipo depressivo induzido pelo TNF- $\alpha$ , no teste de suspensão pela cauda (TSC).
- Averiguar o possível efeito sinérgico da administração aguda de uma dose subativa de  $\alpha$ -tocoferol com doses subativas de antidepressivos clássicos como a fluoxetina, imipramina e bupropiona sobre o comportamento tipo depressivo induzido pela administração de TNF- $\alpha$ .
- Examinar o possível efeito sinérgico da administração aguda de  $\alpha$ -tocoferol (em dose subativa) com dose subativa de um antagonista de receptores NMDA (MK-801) sobre o comportamento tipo depressivo induzido pela administração de TNF- $\alpha$ .
- Verificar o possível efeito sinérgico da administração aguda de  $\alpha$ -tocoferol (em dose subativa) com dose subativa de um inibidor da enzima óxido nítrico sintase neuronal (7-nitroindazol) sobre o comportamento tipo depressivo induzido pela administração de TNF- $\alpha$ .
- Comparar o imunoconteúdo de proteínas envolvidas na apoptose (Bax e Bcl2) e a fosforilação da GSK-3 $\beta$  (no resíduo serina 9) em amostras hipocâmpais de animais tratados com TNF- $\alpha$  ou salina e com  $\alpha$ -tocoferol em doses subativa e ativa.



## 4 MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1 ANIMAIS

Foram utilizados camundongos Swiss fêmeas, pesando entre 30-45g e com idade entre 45 a 55 dias. Os animais foram mantidos a temperatura de 20-22°C com livre acesso à água e comida, em ciclo claro/escuro 12:12 h (ciclo claro iniciando às 7:00 h). Todos os experimentos foram realizados entre 11:00 e 17:00 h, com cada animal usado somente uma vez. Os animais foram ambientados no local da experimentação 24 horas antes da realização dos testes e foram distribuídos de forma aleatória nos grupos experimentais.

Os animais foram fornecidos pelo Biotério Central da Universidade Federal de Santa Catarina e mantidos no Biotério Setorial do Departamento de Bioquímica, no Centro de Ciências Biológicas. Todos os procedimentos foram realizados de acordo com os princípios éticos do Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e foram feitos todos os esforços para minimizar o sofrimento dos animais. Os procedimentos realizados estão aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade Federal de Santa Catarina, sob protocolo da CEUA N° PP00795.

### 4.2 DROGAS E VIAS DE ADMINISTRAÇÃO

Os compostos utilizados foram administrados pelas vias oral (p.o.) ou intraperitoneal (i.p.) em um volume de 10 ml/kg, ou pela via intracerebroventricular (i.c.v.), em um volume constante de 5 µl/sítio. O veículo para os compostos administrados p.o. foi água destilada, e para os compostos administrados via intraperitoneal ou via intracerebroventricular foi salina (NaCl 0,9%).

Os seguintes compostos foram utilizados: DL-all-rac- $\alpha$ -tocoferol (10, 30 e 100 mg/kg, p.o.), fluoxetina (5 mg/kg, p.o.; inibidor seletivo da recaptação de serotonina), imipramina (0,1 mg/kg, p.o.; antidepressivo tricíclico), bupropiona (1 e 10 mg/kg, p.o.; antidepressivo inibidor da recaptação de dopamina e noradrenalina), MK-801 (0,001 mg/kg, p.o.; antagonista de receptores NMDA); e 7-nitroindazol (25 mg/kg, i.p.; inibidor da óxido nítrico sintase neuronal) e TNF- $\alpha$  (0,001 fg/sítio, i.c.v.; citocina pró-inflamatória). O  $\alpha$ -tocoferol foi diluído em óleo mineral com 10% de álcool etílico. Fluoxetina, desipramina, bupropiona e MK-801 foram diluídos em água destilada. O 7-nitroindazol foi diluído em salina com 5% de Tween 80.

O TNF- $\alpha$  foi administrado por via i.c.v., como descrito por Kaster *et al.* (2012). Para a injeção uma agulha 26G foi conectada a uma cânula de polipropileno acoplada a uma microseringa Hamilton de 50  $\mu$ l. Os camundongos foram levemente anestesiados com éter (apenas para a perda dos reflexos posturais) e a administração, em um volume de 5  $\mu$ l/sítio, foi realizada com a inserção da agulha, a mão livre, no ventrículo lateral direito ou esquerdo. Após a dissecação do encéfalo do animal, foi analisado, macroscopicamente, o sucesso da injeção, descartando os animais cuja injeção tenha sido realizada em lugar inadequado ou que tenha causado hemorragia.

Toda os compostos foram obtidas da Sigma Chemical Co. (St. Louis, USA), com exceção da bupropiona, que foi obtida da Libbs Farmaceutica Ltda. (Brasil). As dosagens dos compostos utilizados foram escolhidas baseadas em experimentos prévios do nosso laboratório (CUNHA *et al.*, 2008; BINFARÉ *et al.*, 2009; LOBATO *et al.*, 2010; MORETTI *et al.*, 2011; KASTER *et al.*, 2012).

Para a realização das análises bioquímicas, foram utilizados os anticorpos primários anti-p-GSK-3 $\beta$  (Ser9), anti-GSK-3 $\beta$ , anti-BAX, anti-Bcl2 e anti- $\beta$ -actina e o anticorpo secundário (anti-coelho-IgG conjugado à peroxidase), que foram obtidos da Cell Signaling (Beverly, MA, EUA).

### 4.3. TESTES COMPORTAMENTAIS

#### 4.3.1 Teste da suspensão pela cauda (TSC)

O tempo total de imobilidade foi avaliado durante um período de 6 minutos em camundongos acústica e visualmente isolados, suspensos a 50 cm acima do chão e presos pela extremidade da cauda com fita adesiva (MORETTI *et al.*, 2011), como demonstrado pela **Figura 5**. A validade preditiva do TSC se confirma pelo fato de que os antidepressivos utilizados na clínica reduzem o tempo de imobilidade nesse teste (STERU *et al.*, 1985).



**Figura 5 - Teste de suspensão pela cauda.** Os animais são suspensos a 50 cm acima do chão, presos pela extremidade da cauda com fita adesiva por 6 minutos. O tempo de imobilidade é o parâmetro utilizado.

O teste foi realizado em sala com temperatura e luz controladas, 60 minutos após a administração das substâncias administradas via p.o. ou 30 minutos após a administração de substâncias administradas por via i.p. ou i.c.v.

#### **4.3.2 Avaliação da atividade locomotora**

A fim de excluir a possibilidade de que a diminuição do tempo de imobilidade no TSC seja devido a uma estimulação motora, os animais foram submetidos ao teste do campo aberto (TCA) – durante 6 minutos – (RODRIGUES *et al.*, 2002) 60 minutos após a administração das substâncias administradas via p.o. ou 30 minutos após a administração de substâncias administradas por via i.p. ou i.c.v.

Esse teste foi realizado em uma caixa de madeira medindo 40 x 60 x 50 cm, com a base dividida em 12 quadrados iguais como demonstrado na **Figura 6**. O número de quadrados cruzados com as quatro patas é o parâmetro utilizado para avaliar a atividade locomotora. A base da caixa foi limpa com álcool 10% entre os testes, sendo esse teste realizado em uma sala com temperatura e luz controladas.



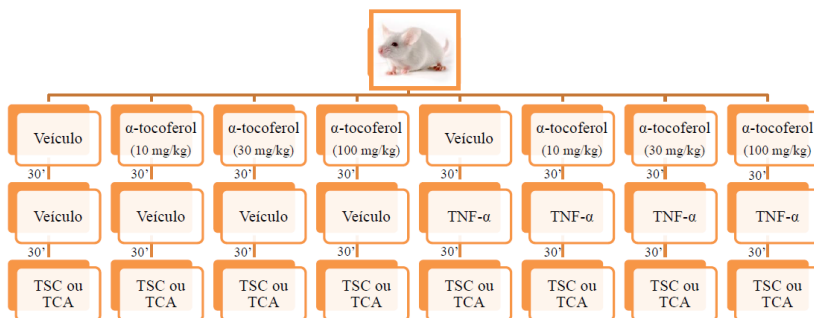
**Figura 6 - Teste do campo aberto.** Os animais são colocados em uma caixa com a base dividida em 12 quadrados iguais. O número de quadrados cruzados com as quatro patas por um período de 6 minutos é o parâmetro utilizado para avaliar a atividade locomotora.

#### 4.4 PROTOCOLOS EXPERIMENTAIS

##### 4.4.1 Investigação da administração aguda de diferentes doses de $\alpha$ -tocoferol com TNF- $\alpha$

Para investigar o efeito preventivo do  $\alpha$ -tocoferol em um modelo animal de comportamento depressivo induzido por TNF- $\alpha$ , os animais receberam (p.o.) veículo ou 3 doses de  $\alpha$ -tocoferol: 10 mg/kg, 30 mg/kg ou 100 mg/kg. Decorridos 30 minutos, os animais receberam uma injeção (i.c.v.) de TNF- $\alpha$  (0,001 fg/sítio, i.c.v.; citocina pró-inflamatória) ou veículo (salina). Após mais 30 minutos, os animais foram submetidos ao TSC ou TCA. A **Figura 7** exemplifica o protocolo:

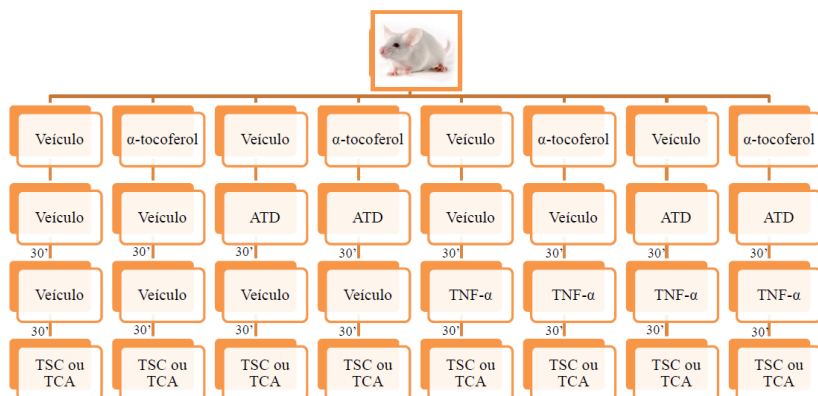




**Figura 7 - Esquema do protocolo da administração de diferentes doses de  $\alpha$ -tocoferol com TNF- $\alpha$**

#### 4.4.2 Investigação da associação do $\alpha$ -tocoferol com antidepressivos e TNF- $\alpha$

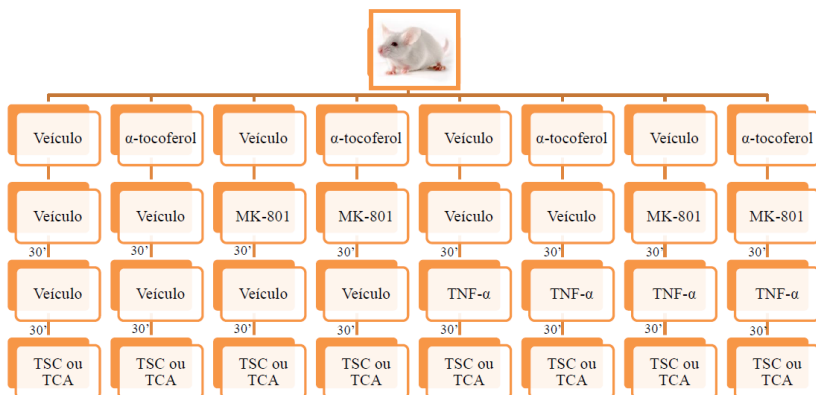
Para investigar um possível efeito sinérgico entre diferentes antidepressivos e o  $\alpha$ -tocoferol, os animais receberam (p.o.) veículo ou uma dose subativa de  $\alpha$ -tocoferol (10 mg/kg). Imediatamente depois, os animais foram tratados com doses subativas de fluoxetina (5 mg/kg, antidepressivo ISRS), imipramina (0,1 mg/kg, antidepressivo tricíclico) ou bupropiona (1 mg/kg, antidepressivo inibidor da recaptação de dopamina e noradrenalina) ou veículo. Decorridos 30 minutos, os animais receberam uma injeção (i.c.v.) de TNF- $\alpha$  (0,001 fg/sítio, citocina pró-inflamatória) ou veículo. Após mais 30 minutos, os animais foram submetidos ao TSC ou TCA. A **Figura 8** exemplifica o protocolo:



**Figura 8 - Esquema do protocolo de associação do  $\alpha$ -tocoferol com antidepressivos (fluoxetina, imipramina e bupropiona) e TNF- $\alpha$ . ATD = antidepressivos.**

#### **4.4.3 Investigação da associação do $\alpha$ -tocoferol com MK-801 e TNF- $\alpha$**

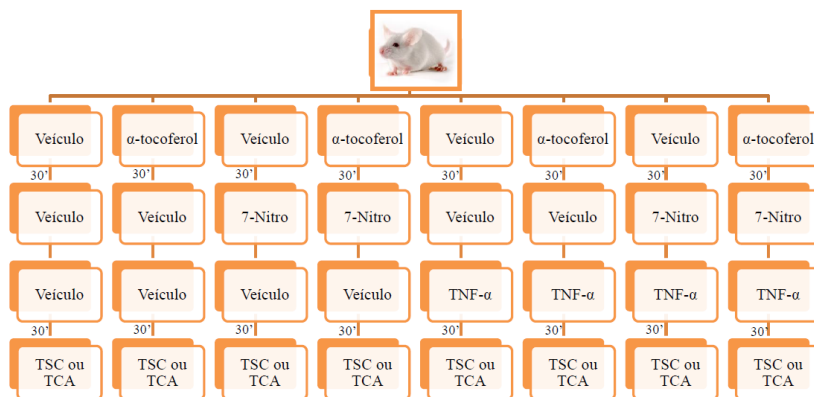
Para investigar um possível efeito sinérgico entre  $\alpha$ -tocoferol e MK-801, os animais receberam (p.o.) veículo ou dose subativa de  $\alpha$ -tocoferol (10 mg/kg). Imediatamente após, os animais foram tratados com uma dose subativa de MK-801 (0,001 mg/kg, p.o.; antagonista de receptores NMDA, p.o.) ou veículo. Decorridos 30 minutos, os animais receberam uma injeção (i.c.v.) de TNF- $\alpha$  (0,001 fg/sítio, citocina pró-inflamatória) ou veículo. Após mais 30 minutos, os animais foram submetidos ao TSC ou TCA. A **Figura 9** exemplifica o protocolo:



**Figura 9 - Esquema do protocolo de associação do  $\alpha$ -tocoferol com MK-801 e TNF- $\alpha$ .**

#### **4.4.4 Investigação da associação do $\alpha$ -tocoferol com 7-nitroindazol e TNF- $\alpha$**

Para investigar um possível efeito sinérgico entre  $\alpha$ -tocoferol e 7-nitroindazol, os animais receberam (p.o.) veículo ou doses subativas de  $\alpha$ -tocoferol (10 mg/kg). Decorridos 30 minutos, os animais receberam, via i.p., uma dose subativa de 7-nitroindazol (25 mg/kg, inibidor da nNOS) ou veículo. Imediatamente após, os animais recebem uma injeção (i.c.v.) de TNF- $\alpha$  (0,001 fg/sítio, citocina pró-inflamatória) ou veículo. Após mais 30 minutos, os animais foram submetidos ao TSC ou TCA. A **Figura 10** exemplifica o protocolo:

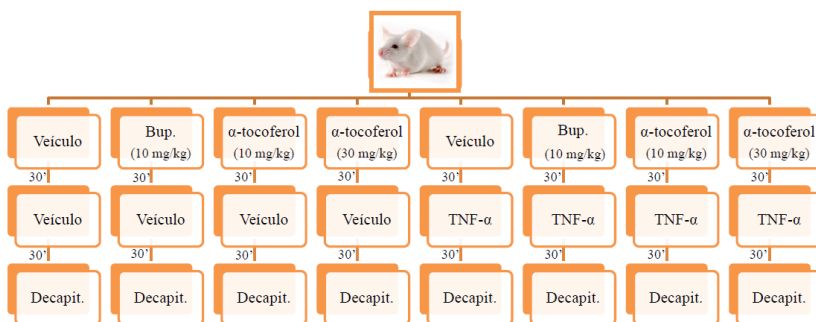


**Figura 10 - Esquema do protocolo de associação do  $\alpha$ -tocoferol com 7-Nitroindazol e TNF- $\alpha$ . 7-Nitro = 7-Nitroindazol.**

#### 4.5 ANÁLISES BIOQUÍMICAS

Para averiguar alguma possível alteração em proteínas envolvidas na apoptose (Bax, Bcl2 e GSK-3 $\beta$ ), *western blotting* foi realizado como descrito anteriormente (LEAL *et al.*, 2002; CORDOVA *et al.*, 2004). Para essas análises foram utilizados os hipocampus dos camundongos. Essa escolha deve-se ao fato de que o hipocampo é uma das estruturas límbicas que tem sido estudada na depressão, podendo contribuir para alguns dos sintomas dessa doença psiquiátrica e por ser uma região muito vulnerável a morte de neurônios (SAPOLSKY, 2000; DUMAN 2004; SAHAY; HEN, 2007).

Os animais utilizados para as análises bioquímicas receberam (p.o.) veículo ou bupropiona em dose ativa (10 mg/kg, antidepressivo inibidor da recaptação de dopamina e noradrenalina) ou 2 doses de  $\alpha$ -tocoferol: 10 mg/kg (dose subativa) ou 30 mg/kg (dose ativa). Decorridos 30 minutos, os animais receberam uma injeção (i.c.v.) de TNF- $\alpha$  (0,001 fg/sítio, citocina pró-inflamatória) ou veículo. Após mais 30 minutos, os animais foram decapitados para posterior análise bioquímica. Vale ressaltar que esses animais não passaram pelos testes comportamentais. A **Figura 11** exemplifica o protocolo:



**Figura 11 - Esquema do protocolo para as análises bioquímicas.**  
Bup. = Bupropiona; Decapit. = decapitação.

Após a decapitação, o encéfalo de cada animal foi removido e os hipocampus foram rapidamente dissecados (4°C) e colocados em nitrogênio líquido e armazenados a -80°C até o uso. As amostras foram preparadas como descrito anteriormente (OLIVEIRA *et al.*, 2008). Resumidamente, os tecidos hipocampais foram homogeneizados mecanicamente em 400 µL de tampão de homogeneização (Tris 50 mM pH 7,0, EDTA 1 mM, fluoreto de sódio 100 mM, PMSF 0,1 mM, Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub> 2 mM, Triton X-100 1%, glicerol 10% e 34 Cocktail inibidor de proteases). Os lisados foram centrifugados (10.000 x g por 10 min, a 4°C) para a eliminação de restos celulares, e o sobrenadante (300µl) diluído 1/1 (v/v) em solução (Tris 100 mM pH 6,8, EDTA 4 mM, SDS 8%) e aquecidos a 100°C por 5 min. Após homogeneização uma alíquota foi retirada para a dosagem de proteínas. Em seguida adicionou-se numa proporção de 1:4 (v/v) a solução de diluição de amostra (glicerol 40%, Tris 25 mM e azul de bromofenol, pH 6,8).

O teor proteico foi estimado através do método descrito por Peterson (1977). A concentração proteica foi estimada a partir de uma curva padrão, utilizando albumina de soro bovino. As proteínas (60 µg de proteína total/poço) foram separadas por eletroforese em gel de poliácridamida (concentração 10% de acrilamida para a análise da GSK-3β (Ser9) e 12% para a análise da Bax, Bcl2 e β-actina) contendo SDS (SDS-PAGE) e gel de entrada com 4% de acrilamida. A seguir, as proteínas foram transferidas para as membranas de nitro-celulose. Para verificar a eficiência do processo de transferência as membranas foram coradas com Ponceau 0,5% em ácido acético 1%.

Após esse processo, as membranas foram bloqueadas durante 1 hora com leite em pó desnatado 5% TBS (Tris 10 mM, NaCl 150 mM,

pH 7,5). As formas fosforiladas e total GSK-3 $\beta$  (Ser9) e o imunoconteúdo de Bax e Bcl2 foram detectados com o uso de anticorpos específicos diluídos em TBS-T contendo soroalbumina bovina (Tris 10 mM, NaCl 150 mM, Tween- 20 0,05%, BSA 2%, pH 7,5) na diluição 1:1000. As membranas ficaram incubadas com o anticorpo de interesse *overnight* a 4°C em agitação constante. No dia seguinte, para a detecção dos complexos imunes, as membranas foram incubadas por 1 hora com anticorpo secundário anti-coelho conjugado com peroxidase (1:5000) e a imunorreatividade das bandas foi revelada por quimioluminescência com o reagente LumiGLO® (Cell Signaling, Beverly, MA, EUA) segundo especificações do fabricante e com o uso de filme radiográfico específico (Amersham Hyperfilm®, GE Healthcare Life Sciences, Piscataway, NJ, EUA). Todas as etapas de bloqueio e incubação foram seguidas por três lavagens (5 minutos cada) das membranas com TBS-T. As membranas foram incubadas com o anticorpo anti- $\beta$ -actina (1:1000) para verificar se a mesma quantidade de proteínas teriam sido aplicadas no gel. A fim de se detectarem as formas fosforilada e total da GSK-3 $\beta$  (Ser9), bem como o imunoconteúdo de Bax, Bcl2 e actina na mesma membrana, os imunocomplexos foram removidos conforme descrito previamente (POSSER *et al.*, 2007). De forma simplificada, as membranas foram lavadas uma vez com água duplamente deionizada (5 minutos), em seguida foram incubadas com NaOH 0,2 M (5 minutos), lavadas com água duplamente deionizada (5 minutos) e por último com TBS-T (5 minutos). As membranas desprovidas de imunocomplexos foram bloqueadas e submetidas ao mesmo protocolo descrito acima.

A densidade óptica (DO) das bandas foi quantificada usando ScionImage software® (Frederick, MD, EUA). O nível de fosforilação da GSK-3 $\beta$  (Ser9) foi determinado pela razão entre a DO fosforilada / DO total. Os imunoconteúdos da Bax e da Bcl2 foram determinados pela relação entre a DO dessas proteínas / DO da  $\beta$ -actina respectiva. Os dados foram expressos como porcentagem em relação ao controle (considerado como 100%).

Os anticorpos anti-p-GSK-3 $\beta$  (Ser9), anti-GSK-3 $\beta$ , anti-Bax, anti-Bcl2 e anti- $\beta$ -actina detectam apenas uma banda de aproximadamente 46 kDa, 46 kDa, 20 kDa, 28 kDa e 45 kDa respectivamente.

#### 4.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados foram avaliados através de análise de variância (ANOVA) de duas ou de três vias (dependendo do protocolo experimental), seguido pelo teste *post-hoc* de Duncan, quando apropriado. Os resultados estão expressos em média + erro padrão da média (E.P.M.). As diferenças entre os grupos foram consideradas significativas para  $p < 0,05$ .





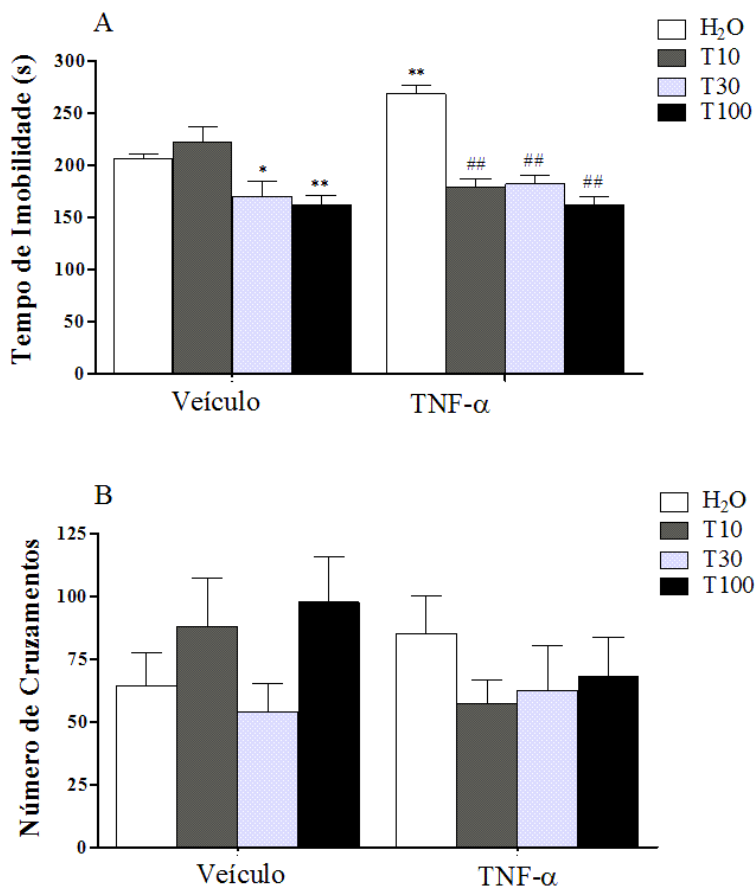
## 5 RESULTADOS

### 5.1 INVESTIGAÇÃO DA ADMINISTRAÇÃO AGUDA DE DIFERENTES DOSES DE $\alpha$ -TOCOFEROL COM TNF- $\alpha$

A **Figura 12** mostra que a administração sistêmica (p.o.) de  $\alpha$ -tocoferol, nas doses de 30 e 100 mg/kg, produziu uma redução no tempo de imobilidade dos animais no TSC ( $p < 0,05$  e  $p < 0,01$  respectivamente), enquanto que a dose de 10 mg/kg mostrou-se inefetiva (painel A). Além disso, a figura também mostra que a administração de TNF- $\alpha$  (via i.c.v.) aumentou o tempo de imobilidade no TSC ( $p < 0,01$ ), que foi prevenido quando ocorreu a administração de  $\alpha$ -tocoferol nas doses de 10, 30 e 100 mg/kg ( $p < 0,01$ ). Nenhum dos tratamentos alterou a atividade locomotora dos animais no TCA (painel B). Os valores de F e de p estão mostrados na **Tabela 2**.

**Tabela 2** – Valores de F e de p do experimento da administração aguda de diferentes doses de  $\alpha$ -tocoferol com TNF- $\alpha$ .

	Valor de F	Valor de p
<b>TSC</b>		
Tratamento TNF- $\alpha$	F(1,56) = 1,149	$p > 0,05$
Tratamento $\alpha$ -tocoferol	F(3,56) = 22,184	$p < 0,01$
Interação do tratamento TNF- $\alpha$ x $\alpha$ -tocoferol	F(3,56) = 9,573	$p < 0,01$
<b>TCA</b>		
Tratamento TNF- $\alpha$	F(1,56) = 0,5033	$p > 0,05$
Tratamento $\alpha$ -tocoferol	F(3,56) = 0,8787	$p > 0,05$
Interação do tratamento TNF- $\alpha$ x $\alpha$ -tocoferol	F(3,56) = 1,4838	$p > 0,05$



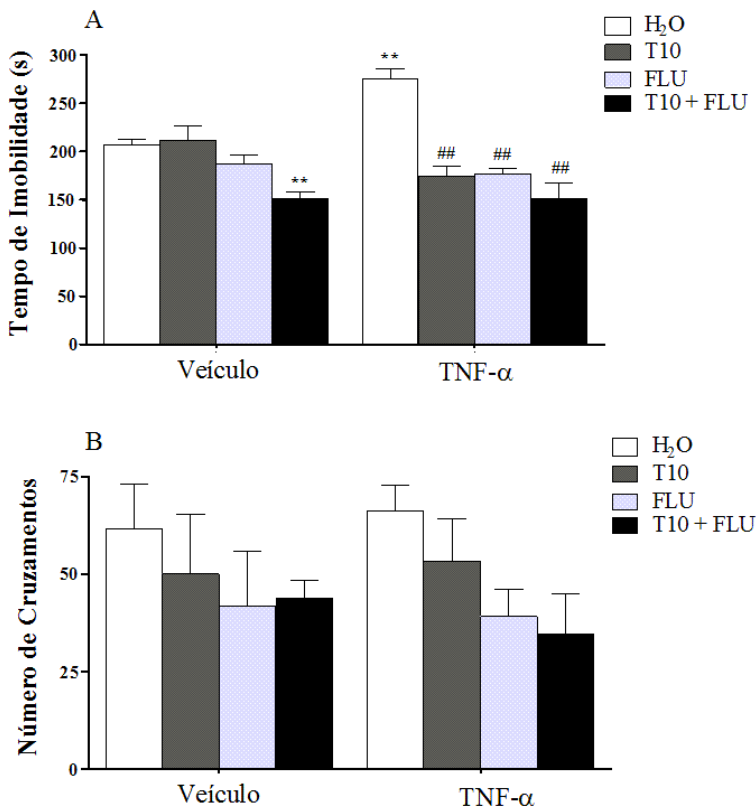
**Figura 12 - Efeito da administração p.o. de  $\alpha$ -tocoferol (T) em diferentes doses (variando de 10 - 100 mg/kg) associada com administração i.c.v. de TNF- $\alpha$  (0,001 fg/sítio) ou veículo sobre o tempo de imobilidade no TSC (painel A) e número de cruzamentos no TCA (painel B). Os valores estão expressos em média + E.P.M. (n = 8). \*p<0,05 e \*\*p<0,01 comparado ao grupo controle (H<sub>2</sub>O/Veículo). ##p<0,01 comparado com o grupo H<sub>2</sub>O/TNF- $\alpha$ .**

## 5.2 INVESTIGAÇÃO DA ASSOCIAÇÃO DO $\alpha$ -TOCOFEROL COM ANTIDEPRESSIVOS E TNF- $\alpha$

A **Figura 13A** mostra que a administração de dose subativa de  $\alpha$ -tocoferol (10 mg/kg, p.o.) em associação com dose subativa de fluoxetina (5 mg/kg, p.o.) diminuiu o tempo de imobilidade dos animais no TSC ( $p < 0,01$ ), enquanto que a administração isolada deles não alterou o tempo de imobilidade em animais que receberam veículo ao invés de TNF- $\alpha$ . Além disso, a figura também mostra que a administração de TNF- $\alpha$  (via i.c.v.) aumentou o tempo de imobilidade no TSC ( $p < 0,01$ ), que foi prevenido quando ocorreu a administração de  $\alpha$ -tocoferol e fluoxetina isolados ou em associação ( $p < 0,01$ ). Nenhum dos tratamentos alterou a atividade locomotora dos animais no TCA (**Figura 13B**). Os valores de F e de p estão mostrados na **Tabela 3**.

**Tabela 3** – Valores de F e de p do experimento da associação do  $\alpha$ -tocoferol com fluoxetina.

	Valor de F	Valor de p
<b>TSC</b>		
Tratamento TNF- $\alpha$	F(1,54) = 0,503	p > 0,05
Tratamento $\alpha$ -tocoferol	F(1,54) = 28,601	p < 0,01
Tratamento fluoxetina	F(1,54) = 46,322	p < 0,01
Interação do tratamento TNF- $\alpha$ x $\alpha$ -tocoferol	F(1,54) = 10,447	p > 0,05
Interação do tratamento TNF- $\alpha$ x fluoxetina	F(1,54) = 2,124	p > 0,05
Interação $\alpha$ -tocoferol x fluoxetina	F(1,54) = 1,287	p > 0,05
Interação TNF- $\alpha$ x $\alpha$ -tocoferol x fluoxetina	F(1,54) = 15,558	p < 0,01
<b>TCA</b>		
Tratamento TNF- $\alpha$	F(1,56) = 0,0175	p > 0,05
Tratamento $\alpha$ -tocoferol	F(1,56) = 0,7974	p > 0,05
Tratamento fluoxetina	F(1,56) = 5,6311	p < 0,05
Interação do tratamento TNF- $\alpha$ x $\alpha$ -tocoferol	F(1,56) = 0,0657	p > 0,05
Interação do tratamento TNF- $\alpha$ x fluoxetina	F(1,56) = 0,4159	p > 0,05
Interação $\alpha$ -tocoferol x fluoxetina	F(1,56) = 0,5294	p > 0,05
Interação TNF- $\alpha$ x $\alpha$ -tocoferol x fluoxetina	F(1,56) = 0,0301	p > 0,05



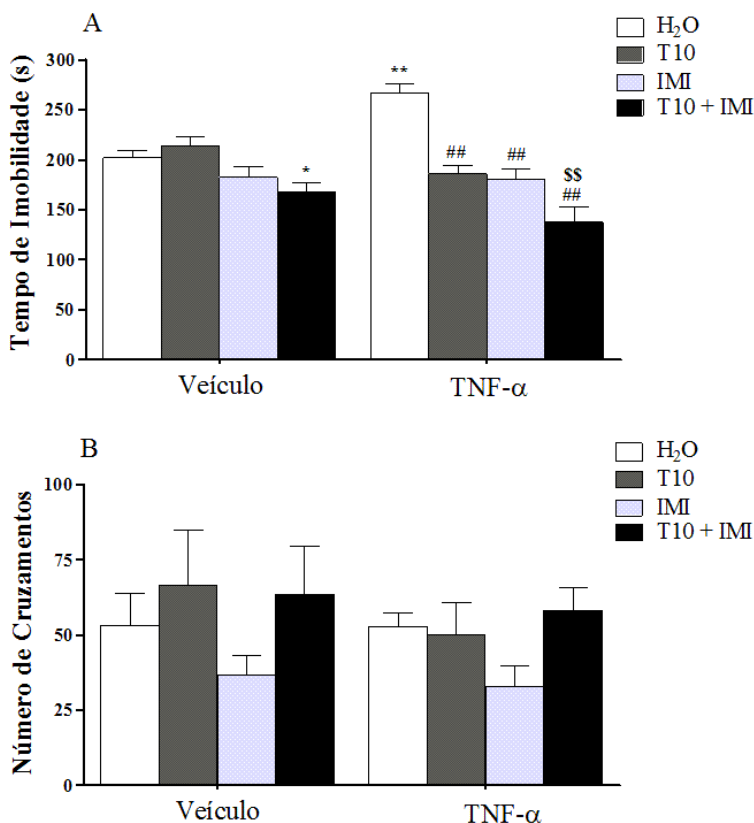
**Figura 13 - Efeito da administração de dose subativa de  $\alpha$ -tocoferol (T) (10 mg/kg, p.o.) e/ou dose subativa de fluoxetina (FLU) (5 mg/kg, p.o.), associada com administração i.c.v. de TNF- $\alpha$  (0,001 fg/sítio) ou veículo sobre o tempo de imobilidade no TSC (painel A) e número de cruzamentos no TCA (painel B). Os valores estão expressos em média + E.P.M. (n = 7-8). \*\*p<0,01 comparado ao grupo controle (H<sub>2</sub>O/Veículo). ##p<0,01 comparado com o grupo H<sub>2</sub>O/TNF- $\alpha$ .**

Como mostrado na **Figura 14A**, a administração de uma dose subativa de  $\alpha$ -tocoferol (10 mg/kg, p.o.) combinada com uma dose subativa de imipramina (0,1 mg/kg, p.o.) reduziu o tempo de imobilidade dos animais no TSC (p < 0,01), enquanto que a administração isolada de  $\alpha$ -tocoferol ou imipramina em doses subativas não alterou esse parâmetro. A administração de TNF- $\alpha$  (via i.c.v.) aumentou o tempo de imobilidade no TSC (p < 0,01).

Quando os animais foram pré-tratados com  $\alpha$ -tocoferol e/ou com imipramina nas doses subativas, foi observado uma prevenção no aumento do tempo de imobilidade causado pelo TNF- $\alpha$  ( $p < 0,01$ ). Além disso, em animais que receberam TNF- $\alpha$ , o tratamento combinado com  $\alpha$ -tocoferol e imipramina apresentou um efeito tipo antidepressivo sinérgico no TSC, com uma diminuição do tempo de imobilidade estatisticamente mais significativa do que a administração isolada de  $\alpha$ -tocoferol ( $p < 0,01$ ) ou imipramina ( $p < 0,01$ ). Nenhum dos tratamentos alterou a atividade locomotora dos animais no TCA (**Figura 14B**). Os valores de F e de p estão mostrados na **Tabela 4**.

**Tabela 4** – Valores de F e de p do experimento da associação do  $\alpha$ -tocoferol com imipramina.

	Valor de F	Valor de p
<b>TSC</b>		
Tratamento TNF- $\alpha$	F(1,56) = 0,035	p > 0,05
Tratamento $\alpha$ -tocoferol	F(1,56) = 19,655	p < 0,01
Tratamento imipramina	F(1,56) = 48,260	p < 0,01
Interação do tratamento TNF- $\alpha$ x $\alpha$ -tocoferol	F(1,56) = 17,781	p < 0,01
Interação do tratamento TNF- $\alpha$ x imipramina	F(1,56) = 5,661	p < 0,05
Interação $\alpha$ -tocoferol x imipramina	F(1,56) = 0,162	p > 0,05
Interação TNF- $\alpha$ x $\alpha$ -tocoferol x imipramina	F(1,56) = 4,981	p < 0,05
<b>TCA</b>		
Tratamento TNF- $\alpha$	F(1,54) = 0,6731	p > 0,05
Tratamento $\alpha$ -tocoferol	F(1,54) = 3,8402	p > 0,05
Tratamento imipramina	F(1,54) = 0,9842	p > 0,05
Interação do tratamento TNF- $\alpha$ x $\alpha$ -tocoferol	F(1,54) = 0,3057	p > 0,05
Interação do tratamento TNF- $\alpha$ x imipramina	F(1,54) = 0,0580	p > 0,05
Interação $\alpha$ -tocoferol x imipramina	F(1,54) = 1,7009	p > 0,05
Interação TNF- $\alpha$ x $\alpha$ -tocoferol x imipramina	F(1,54) = 0,1988	p > 0,05



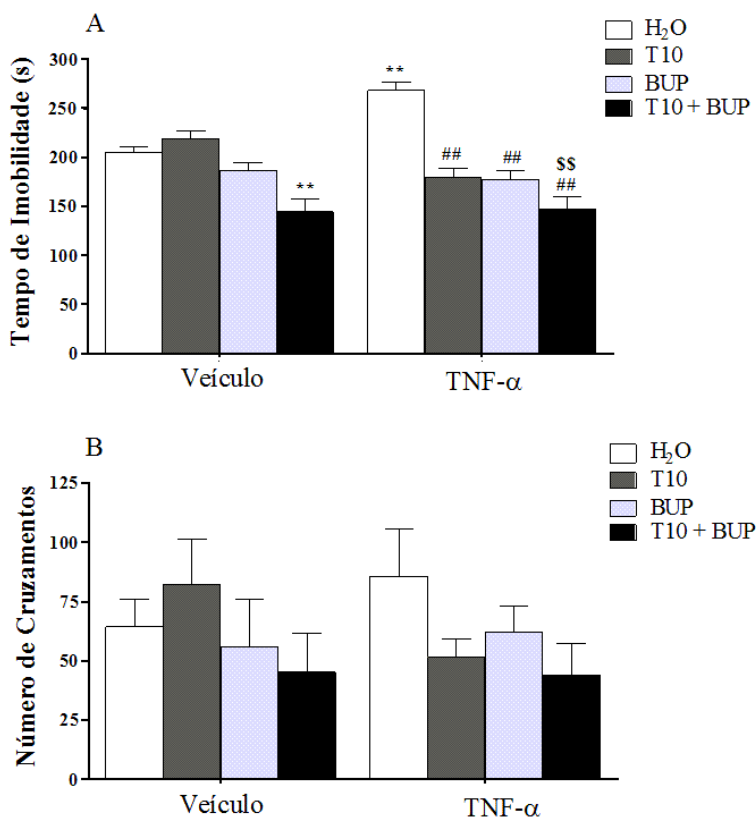
**Figura 14 - Efeito da administração de dose subativa de  $\alpha$ -tocoferol (T) (10 mg/kg, p.o.) e/ou dose subativa de imipramina (IMI) (0,1 mg/kg, p.o.), associada com administração i.c.v. de TFN- $\alpha$  (0,001 fg/sítio) ou veículo sobre o tempo de imobilidade no TSC (painel A) e número de cruzamentos no TCA (painel B). Os valores estão expressos em média + E.P.M. (n = 7-8). \* $p < 0,05$  e \*\* $p < 0,01$  comparado ao grupo controle ( $H_2O$ /Veículo). ## $p < 0,01$  comparado com o grupo  $H_2O$ /TNF- $\alpha$ . \$\$ $p < 0,01$  comparado com o grupo T10/TNF- $\alpha$  e com o grupo IMI/TNF- $\alpha$ .**

Em relação à associação de dose subativa de  $\alpha$ -tocoferol (10 mg/kg, p.o.) com dose subativa de bupropiona (1 mg/kg, p.o.) percebe-se, através da **Figura 14A**, que esse tratamento combinado diminuiu o

tempo de imobilidade dos animais no TSC ( $p < 0,01$ ), enquanto que a administração isolada dessa vitamina e desse antidepressivo não alterou a imobilidade dos animais que recebam salina (ao invés de TNF- $\alpha$ ). Nota-se ainda, que a administração de TNF- $\alpha$  (via i.c.v.) aumentou o tempo de imobilidade no TSC ( $p < 0,01$ ), e que a administração de  $\alpha$ -tocoferol e bupropiona, isolados ou em associação, impediu o efeito do TNF- $\alpha$  no tempo de imobilidade no TSC ( $p < 0,01$ ). Além disso, em animais que receberam TNF- $\alpha$ , o tratamento associado de  $\alpha$ -tocoferol com bupropiona proporcionou um efeito sinérgico na diminuição do tempo de imobilidade no TSC, apresentando valores estatisticamente mais baixos do que a administração isolada de  $\alpha$ -tocoferol ( $p < 0,01$ ) ou de bupropiona ( $p < 0,01$ ). Através da **Figura 15B**, nota-se que nenhum dos tratamentos alterou a atividade locomotora dos animais no TCA. Os valores de F e de p estão mostrados na **Tabela 5**.

**Tabela 5** – Valores de F e de p do experimento da associação do  $\alpha$ -tocoferol com bupropiona.

	Valor de F	Valor de p
<b>TSC</b>		
Tratamento TNF- $\alpha$	F(1,56) = 0,381	$p > 0,05$
Tratamento $\alpha$ -tocoferol	F(1,56) = 30,541	$p < 0,01$
Tratamento bupropiona	F(1,56) = 56,577	$p < 0,01$
Interação do tratamento TNF- $\alpha$ x $\alpha$ -tocoferol	F(1,56) = 11,522	$p < 0,01$
Interação do tratamento TNF- $\alpha$ x bupropiona	F(1,56) = 1,344	$p < 0,05$
Interação $\alpha$ -tocoferol x bupropiona	F(1,56) = 0,015	$p > 0,05$
Interação TNF- $\alpha$ x $\alpha$ -tocoferol x bupropiona	F(1,56) = 18,102	$p < 0,01$
<b>TCA</b>		
Tratamento TNF- $\alpha$	F(1,56) = 0,0118	$p > 0,05$
Tratamento $\alpha$ -tocoferol	F(1,56) = 1,0354	$p > 0,05$
Tratamento bupropiona	F(1,56) = 3,1204	$p > 0,05$
Interação do tratamento TNF- $\alpha$ x $\alpha$ -tocoferol	F(1,56) = 1,8511	$p > 0,05$
Interação do tratamento TNF- $\alpha$ x bupropiona	F(1,56) = 0,1138	$p > 0,05$
Interação $\alpha$ -tocoferol x bupropiona	F(1,56) = 0,0753	$p > 0,05$
Interação TNF- $\alpha$ x $\alpha$ -tocoferol x bupropiona	F(1,56) = 1,0354	$p > 0,05$



**Figura 15 - Efeito da administração de dose subativa de  $\alpha$ -tocoferol (T) (10 mg/kg, p.o.) e/ou dose subativa de bupropiona (BUP) (1 mg/kg, p.o.), associada com administração i.c.v. de TFN- $\alpha$  (0,001 fg/sítio) ou veículo sobre o tempo de imobilidade no TSC (painel A) e número de cruzamentos no TCA (painel B). Os valores estão expressos em média + E.P.M. (n = 8). \*\*p<0,01 comparado ao grupo controle ( $H_2O$ /Veículo). ##p<0,01 comparado com o grupo  $H_2O$ /TNF- $\alpha$ . \$\$p<0,01 comparado com o grupo T10/TNF- $\alpha$  e com o grupo BUP/TNF- $\alpha$ .**

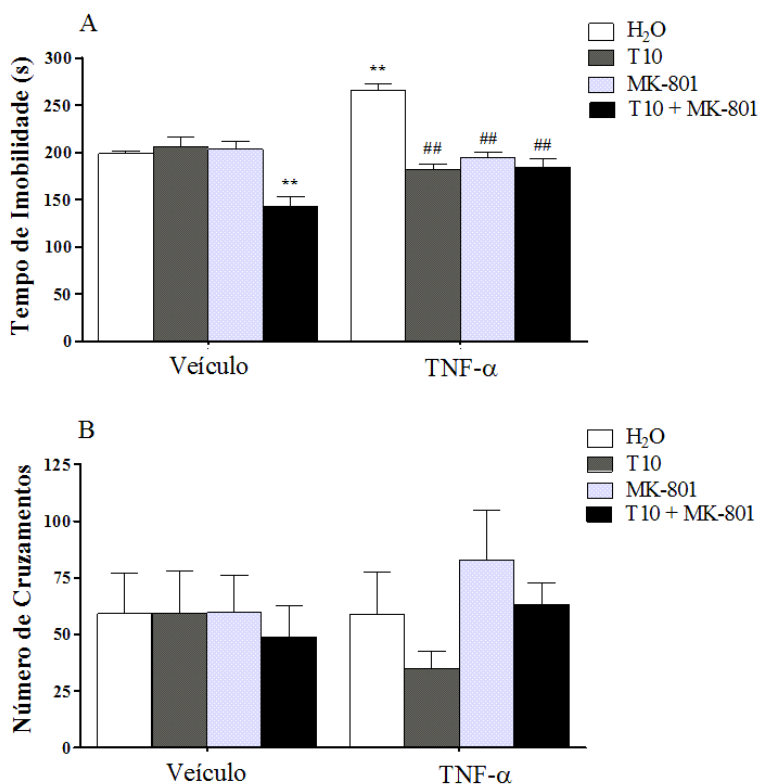


### 5.3 INVESTIGAÇÃO DA ASSOCIAÇÃO DO $\alpha$ -TOCOFEROL COM MK-801 E TNF- $\alpha$

Como pode ser observado na **Figura 16A**, a administração de uma dose subativa de  $\alpha$ -tocoferol (10 mg/kg, p.o.) combinada com uma dose subativa de MK-801 (0,001 mg/kg, p.o.) reduziu o tempo de imobilidade dos animais no TSC ( $p < 0,01$ ), enquanto que a administração isolada de  $\alpha$ -tocoferol ou MK-801 não alterou esse parâmetro. Além disso, a figura demonstra que a administração de TNF- $\alpha$  (via i.c.v.) levou a um aumento no tempo de imobilidade no TSC ( $p < 0,01$ ), que foi prevenido quando ocorreu a administração de  $\alpha$ -tocoferol e MK-801 isolados ou em associação ( $p < 0,01$ ). Nenhum dos tratamentos alterou a atividade locomotora dos animais no TCA (**Figura 16B**). Os valores de F e de p estão mostrados na **Tabela 6**.

**Tabela 6** – Valores de F e de p do experimento da associação do  $\alpha$ -tocoferol com MK-801.

	Valor de F	Valor de p
<b>TSC</b>		
Tratamento TNF- $\alpha$	F(1,56) = 12,735	$p < 0,01$
Tratamento $\alpha$ -tocoferol	F(1,56) = 45,693	$p < 0,01$
Tratamento MK-801	F(1,56) = 33,893	$p < 0,01$
Interação do tratamento TNF- $\alpha$ x $\alpha$ -tocoferol	F(1,56) = 3,349	$p > 0,05$
Interação do tratamento TNF- $\alpha$ x MK-801	F(1,56) = 0,253	$p > 0,05$
Interação $\alpha$ -tocoferol x MK-801	F(1,56) = 0,069	$p > 0,05$
Interação TNF- $\alpha$ x $\alpha$ -tocoferol x MK-801	F(1,56) = 41,909	$p < 0,01$
<b>TCA</b>		
Tratamento TNF- $\alpha$	F(1,56) = 0,0804	$p > 0,05$
Tratamento $\alpha$ -tocoferol	F(1,56) = 1,3741	$p > 0,05$
Tratamento MK-801	F(1,56) = 0,8192	$p > 0,05$
Interação do tratamento TNF- $\alpha$ x $\alpha$ -tocoferol	F(1,56) = 0,5024	$p > 0,05$
Interação do tratamento TNF- $\alpha$ x MK-801	F(1,56) = 1,8431	$p > 0,05$
Interação $\alpha$ -tocoferol x MK-801	F(1,56) = 0,0201	$p > 0,05$
Interação TNF- $\alpha$ x $\alpha$ -tocoferol x MK-801	F(1,56) = 0,1256	$p > 0,05$



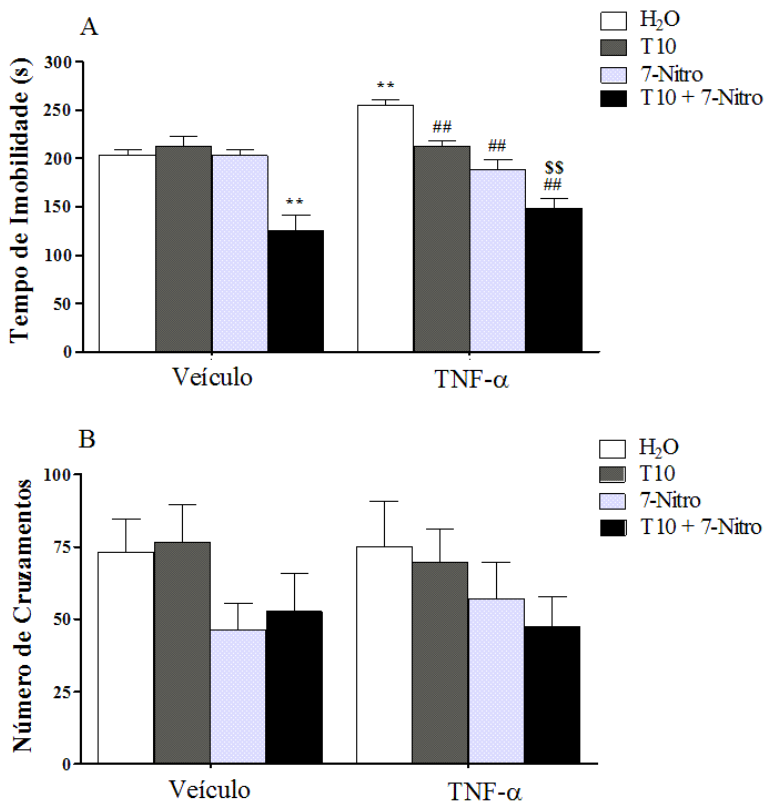
**Figura 16 - Efeito da administração de dose subativa de  $\alpha$ -tocoferol (T) (10 mg/kg, p.o.) e/ou dose subativa de MK-801 (0,001 mg/kg, p.o.), associada com administração i.c.v. de TFN- $\alpha$  (0,001 fg/sítio) ou veículo sobre o tempo de imobilidade no TSC (painel A) e número de cruzamentos no TCA (painel B). Os valores estão expressos em média + E.P.M. (n = 7-8). \*\*p<0,01 comparado ao grupo controle ( $H_2O$ /Veículo). ##p<0,01 comparado com o grupo  $H_2O$ /TNF- $\alpha$ .**

#### 5.4 INVESTIGAÇÃO DA ASSOCIAÇÃO DO $\alpha$ -TOCOFEROL COM 7-NITROINDAZOL E TNF- $\alpha$

A **Figura 17A** mostra que a administração de uma dose subativa de  $\alpha$ -tocoferol (10 mg/kg, p.o.) combinada com uma dose subativa de 7-nitroindazol (0,1 mg/kg, p.o.) reduziu o tempo de imobilidade dos animais no TSC ( $p < 0,01$ ), enquanto que a administração isolada dos mesmos não alterou esse parâmetro. Os animais que receberam TNF- $\alpha$  (via i.c.v.) tiveram um aumento no tempo de imobilidade no TSC ( $p < 0,01$ ). Entretanto, quando os animais foram pré-tratados com  $\alpha$ -tocoferol e/ou 7-nitroindazol antes de receber a injeção de TNF- $\alpha$ , foi possível prevenir o comportamento tipo depressivo induzido pelo TNF- $\alpha$  ( $p < 0,01$ ). Além disso, em animais que também receberam TNF- $\alpha$ , o tratamento combinado de  $\alpha$ -tocoferol com 7-nitroindazol levou a um efeito sinérgico na diminuição do tempo de imobilidade no TSC, apresentando valores estatisticamente mais baixos do que a administração isolada de  $\alpha$ -tocoferol ( $p < 0,01$ ) ou 7-nitroindazol ( $p < 0,01$ ). Da mesma forma que nos experimentos anteriores, nenhum dos tratamentos alterou a atividade locomotora dos animais no TCA (**Figura 17B**). Os valores de F e de p estão mostrados na **Tabela 7**.

**Tabela 7** – Valores de F e de p do experimento da associação do  $\alpha$ -tocoferol com 7-Nitroindazol.

	<b>Valor de F</b>	<b>Valor de p</b>
<b>TSC</b>		
Tratamento TNF- $\alpha$	$F(1,54) = 4,740$	$p < 0,05$
Tratamento $\alpha$ -tocoferol	$F(1,54) = 30,058$	$p < 0,01$
Tratamento 7-Nitroindazol	$F(1,54) = 62,955$	$p < 0,01$
Interação do tratamento TNF- $\alpha$ x $\alpha$ -tocoferol	$F(1,54) = 0,227$	$p > 0,05$
Interação do tratamento TNF- $\alpha$ x 7-Nitroindazol	$F(1,54) = 2,582$	$p > 0,05$
Interação $\alpha$ -tocoferol x 7-Nitroindazol	$F(1,54) = 9,342$	$p < 0,01$
Interação TNF- $\alpha$ x $\alpha$ -tocoferol x 7-Nitroindazol	$F(1,54) = 10,116$	$p < 0,01$
<b>TCA</b>		
Tratamento TNF- $\alpha$	$F(1,55) = 0,0005$	$p > 0,05$
Tratamento $\alpha$ -tocoferol	$F(1,55) = 0,0208$	$p > 0,05$
Tratamento 7-Nitroindazol	$F(1,55) = 6,8051$	$p < 0,05$
Interação do tratamento TNF- $\alpha$ x $\alpha$ -tocoferol	$F(1,55) = 0,5174$	$p > 0,05$
Interação do tratamento TNF- $\alpha$ x 7-Nitroindazol	$F(1,55) = 0,0958$	$p > 0,05$
Interação $\alpha$ -tocoferol x 7-Nitroindazol	$F(1,55) = 0,0019$	$p > 0,05$
Interação TNF- $\alpha$ x $\alpha$ -tocoferol x 7-Nitroindazol	$F(1,55) = 0,0407$	$p > 0,05$



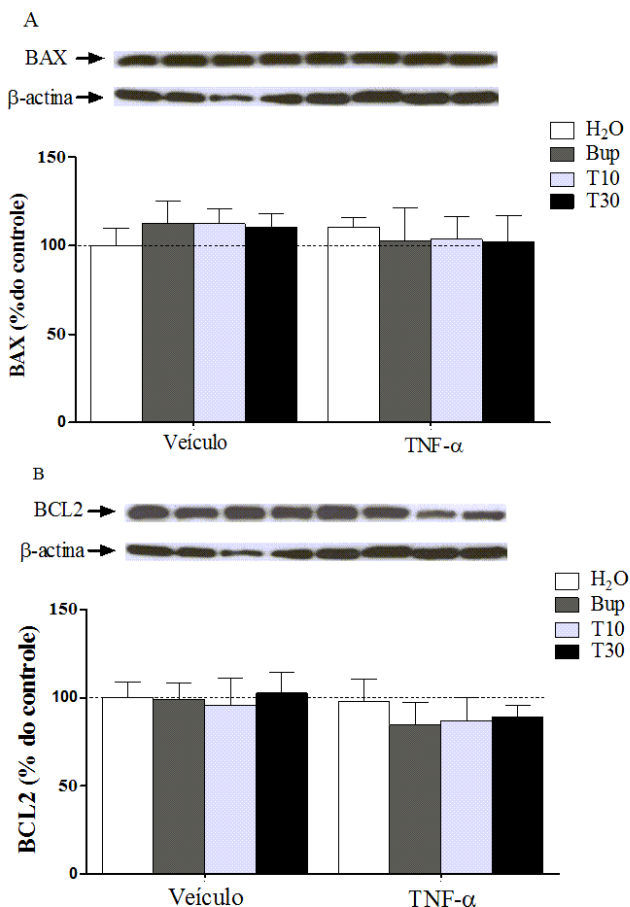
**Figura 17 - Efeito da administração de dose subativa de  $\alpha$ -tocoferol (T) (10 mg/kg, p.o.) e/ou dose subativa de 7-nitroindazol (7-Nitro) (25 mg/kg, p.o.), associada com administração i.c.v. de TNF- $\alpha$  (0,001 fg/sítio) ou veículo sobre o tempo de imobilidade no TSC (painel A) e número de cruzamentos no TCA (painel B). Os valores estão expressos em média + E.P.M. (n = 7-8). \*\*p<0,01 comparado ao grupo controle ( $H_2O$ /Veículo). ##p<0,01 comparado com o grupo  $H_2O$ /TNF- $\alpha$ . \$\$p<0,01 comparado com o grupo T10/TNF- $\alpha$  e com o grupo 7-Nitro/TNF- $\alpha$ .**

## 5.5 ANÁLISES BIOQUÍMICAS

A **Figura 18** mostra um *western blotting* representativo do efeito da administração do TNF- $\alpha$  e do tratamento com  $\alpha$ -tocoferol em dose subativa (10 mg/kg) e ativa (30 mg/kg) e do tratamento com bupropiona em dose ativa (10 mg/kg) sobre o imunoconteúdo da Bax e Bcl2 no hipocampo de camundongos. A análise densitométrica não revelou alterações nem no imunoconteúdo da Bax (**Figura 18A**), nem no imunoconteúdo da Bcl2 (**Figura 18B**) após 1 hora de tratamento com  $\alpha$ -tocoferol ou bupropiona e/ou 30 minutos após a administração de TNF- $\alpha$ . Os valores de F e de p estão mostrados na **Tabela 8**.

**Tabela 8** – Valores de F e de p das análises bioquímicas: Bax e Bcl2.

	Valor de F	Valor de p
<b>Bax</b>		
Tratamento TNF- $\alpha$	F(1,24) = 0,2278	p > 0,05
Tratamento	F(3,24) = 0,0225	p > 0,05
Interação do tratamento TNF- $\alpha$ x tratamento	F(3,24) = 0,3318	p > 0,05
<b>Bcl2</b>		
Tratamento TNF- $\alpha$	F(1,24) = 1,4328	p > 0,05
Tratamento	F(3,24) = 0,2001	p > 0,05
Interação do tratamento TNF- $\alpha$ x tratamento	F(3,24) = 0,1221	p > 0,05

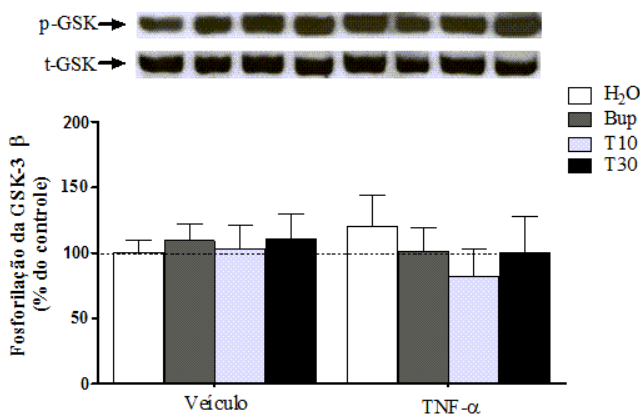


**Figura 18 - Efeito da administração de dose subativa (10 mg/kg, p.o.) ou ativa (30 mg/kg, p.o.) de  $\alpha$ -tocoferol (T) ou dose ativa de bupropiona (BUP) (10 mg/kg, p.o.), associada com administração i.c.v. de TFN- $\alpha$  (0,001 fg/sítio) ou veículo sobre o conteúdo da Bax (painel A) e Bcl2 (painel B), no hipocampo de camundongos. A fosforilação foi avaliada por *Western blotting* e a revelação foi realizada por quimioluminescência. A densitometria das bandas foi determinada usando o programa Scion Image®. Uma imagem representativa e a análise quantitativa normalizada para a  $\beta$ -actina são mostradas. Os dados representam a porcentagem em relação ao controle (linha tracejada) e expressam a média + E.P.M. (n = 4).**

A **Figura 19** mostra a fosforilação e o conteúdo total da GSK-3 $\beta$  por *Western blotting*. Como demonstrado, 30 minutos após o tratamento com TNF- $\alpha$  ou 1 hora após o tratamento com o  $\alpha$ -tocoferol na dose subativa (10 mg/kg) ou ativa (30 mg/kg), a fosforilação da GSK-3 $\beta$  no hipocampo dos camundongos não sofreu qualquer modificação. A fosforilação dessa proteína também não foi alterada em animais tratados com bupropiona. Os valores de F e de p estão mostrados na **Tabela 9**.

**Tabela 9** – Valores de F e de p das análises bioquímicas: GSK-3 $\beta$ .

	Valor de F	Valor de p
Tratamento TNF- $\alpha$	F(1,24) = 0,1178	p > 0,05
Tratamento	F(3,24) = 0,2869	p > 0,05
Interação do tratamento TNF- $\alpha$ x tratamento	F(3,24) = 0,3998	p > 0,05



**Figura 19** - Efeito da administração de dose subativa (10 mg/kg, p.o.) ou ativa (30 mg/kg, p.o.) de  $\alpha$ -tocoferol (T) ou dose ativa de bupropiona (BUP) (10 mg/kg, p.o.), associada com administração i.c.v. de TNF- $\alpha$  (0,001 fg/sítio) ou veículo sobre a fosforilação da GSK-3 $\beta$  no hipocampo de camundongos. A fosforilação foi avaliada por *Western blotting* e a revelação foi realizada por quimioluminescência. A densitometria das bandas foi determinada usando o programa Scion Image®. Uma imagem representativa e a análise quantitativa normalizada para a GSK-3 $\beta$  são mostradas. Os dados representam a porcentagem em relação ao controle (linha tracejada) e expressam a média + E.P.M. (n = 4).



## 6 DISCUSSÃO

Este estudo demonstrou que: a) o TNF- $\alpha$  administrado de forma aguda e centralmente (i.c.v.) propiciou um comportamento tipo depressivo no TSC; b) diferentes doses de  $\alpha$ -tocoferol, um das formas mais abundantes da vitamina E, administradas de forma sistêmica (p.o.) e aguda foram efetivas em impedir o efeito comportamental induzido pelo TNF- $\alpha$ ; c) o efeito da vitamina E parece ser mediado, pelo menos em parte, por uma interação com os sistemas serotoninérgico, noradrenérgico, dopaminérgico e glutamatérgico (via receptores NMDA) e com a via da L-arginina-NO; d) nem o tratamento com TNF- $\alpha$  e nem com o  $\alpha$ -tocoferol foi capaz de alterar o imunconteúdo ou fosforilação de algumas proteínas envolvidas na apoptose.

Os modelos de validade preditiva são determinados através da validação farmacológica, ou seja, drogas clinicamente eficazes para o tratamento de determinada doença que conseguem mostrar efetividade no teste ou modelo (MCARTHUR; BORSINI, 2006). No presente estudo, utilizou-se o TSC, que é um modelo preditivo para avaliação de atividade antidepressiva. Nesse teste, após o animal ser exposto a uma situação inescapável, mensura-se o tempo que o animal fica imóvel, sendo que um decréscimo nesse tempo de imobilidade é considerado um efeito tipo antidepressivo (CRYAN; MOMBÉREAU; VASSOUT, 2005; MCARTHUR; BORSINI, 2006), e substâncias ou situações que levam a um aumento no tempo de imobilidade são consideradas depressiôgenas (MAKINO *et al.*, 1998; DUNN; SWIERGIEL, 2005; MORETTI *et al.*, 2012b). A validação preditiva do TSC confirma-se pelo fato de que a maioria dos antidepressivos utilizados na clínica, como por exemplo, os ISRS, antidepressivos tricíclicos, inibidores seletivos da recaptação de dopamina e noradrenalina e inibidores da MAO reduzem o tempo de imobilidade dos animais nesse teste, sendo que ocorrem diferentes respostas em diferentes linhagens (STERU *et al.*, 1985; CRYAN; MOMBÉREAU; VASSOUT, 2005).

No entanto, existem drogas como os psicoestimulantes que podem gerar resultados “falsos positivos” nos testes preditivos de avaliação de atividade antidepressiva. Isso ocorre devido ao fato desses fármacos aumentarem a atividade motora do animal, influenciando no tempo de imobilidade dos testes preditivos (BORSINI; MELI, 1988). Dessa forma, para descartar a possibilidade de que a diminuição no tempo de imobilidade de uma determinada substância no TSC não tenha ocorrido por um aumento da atividade motora dos animais, realiza-se o TCA.

O  $\alpha$ -tocoferol é um dos isômeros mais abundantes da vitamina E e desempenha inúmeras funções na saúde humana (BRAMLEY *et al.*, 2000; SCHNEIDER, 2005). Dentre as funções mais conhecidas da vitamina E, destaca-se o seu papel como antioxidante e anti-inflamatório (BRIGELIUS-FLOHÉ; TRABER, 1999; SMOLAREK *et al.*, 2012). Essas funções, por si só, já poderiam possibilitar uma melhora na depressão, já que é amplamente conhecido que o estresse oxidativo e a inflamação estão envolvidos na fisiopatologia da depressão (BILICI *et al.*, 2001; YANIK; EREL; KATI, 2004; MAES *et al.*, 2009; MILLER; MALETIC; RAISON, 2009).

A vitamina E também é importante para o SNC, sendo importante, por exemplo, para a melhora na função cognitiva (ORTEGA *et al.*, 2002), para a diminuição na ansiedade (HUGHES; LOWTHER; VAN NOBELLEN, 2011) e para a diminuição no risco de doença de Alzheimer (MANGIALASCHE *et al.*, 2010) e doença de Parkinson (ETMINAN; GILL; SAMII, 2005). Em relação à depressão, existem alguns trabalhos clínicos que mostram uma relação entre esse transtorno de humor e a vitamina E, associando uma menor concentração plasmática ou sérica dessa vitamina com a presença de depressão ou sintomas depressivos ou com um menor estado de saúde mental (MAES *et al.*, 2000; OWEN *et al.*, 2005; CAPURON *et al.*, 2009), bem como correlacionando uma menor ingestão dietética de vitamina E com um aumento nos sintomas depressivos (GERMAN *et al.*, 2011).

Em estudos pré-clínicos, Berg e colaboradores (2004) e Godbout e colaboradores (2005), embora não tenham realizado modelos específicos para depressão, mostraram que o  $\alpha$ -tocoferol atenuou o “sickness behavior” (que possui alguns sintomas semelhantes ao da depressão) induzido por LPS (BERG *et al.*, 2004; GODBOUT *et al.*, 2005), bem como diminuiu a expressão de NF $\kappa$ B, IL-6, IL-1 $\beta$  e TNF- $\alpha$  no encéfalo de camundongos que haviam recebido LPS (GODBOUT *et al.*, 2005). Além disso, dois estudos pré-clínicos utilizando testes preditivos para avaliação da atividade antidepressiva (TSC e/ou TNF), demonstraram que o  $\alpha$ -tocoferol diminui o tempo de imobilidade nesses testes tanto em camundongos (LOBATO *et al.*, 2010) quanto em ratos (PARVEEN *et al.*, 2011).

No presente estudo,  $\alpha$ -tocoferol administrado de forma aguda nas doses de 30 mg/kg e 100 mg/kg diminuiu o tempo de imobilidade no TSC, enquanto que na dose de 10 mg/kg não foi observado esse efeito, sendo considerada uma dose subativa (**Figura 12A**). Esses resultados são semelhantes aos resultados prévios encontrados por Lobato *et al.* (2010), no qual as doses de 30 mg/kg e de 100 mg/kg diminuíram o

tempo de imobilidade no TSC e TNF. Nem no presente estudo, nem no estudo de Lobato *et al.* (2010) foi observado alteração no TCA, o que demonstra que o  $\alpha$ -tocoferol não altera a atividade locomotora do animal, sugerindo que essa vitamina apresenta um efeito tipo antidepressivo.

Utilizou-se como modelo experimental a indução de comportamento tipo depressivo pela administração de TNF- $\alpha$  em camundongos. O TNF- $\alpha$  é uma proteína que pode ser produzida por diversos tipos celulares, incluindo monócitos, linfócitos, macrófagos, células gliais e neurônios em resposta a uma infecção, injúria, inflamação ou outras mudanças ambientais (TCHELINGERIAN; VIGNAIS; JACQUE, 1994; KRONFOL; REMICK, 2000; BAUD; KARIN, 2001). Essa citocina exerce suas ações por interagir com receptores específicos para o TNF do tipo 1 e 2, levando a ativação de uma cascata de sinalização que regula vias pró- e antiapoptóticas, proliferação e inflamação celular (BAUD; KARIN, 2001).

Após os animais serem tratados com a citocina inflamatória TNF- $\alpha$ , na dose de 0,001 fg/sítio (i.c.v.), observou-se, no presente estudo, um aumento no tempo de imobilidade no TSC, sugerindo um efeito tipo depressivo dessa citocina. Resultado semelhante foi encontrado por Kaster e colaboradores (2012), em um estudo no qual essa mesma dose de TNF- $\alpha$  também aumentou o tempo de imobilidade no TSC, além de doses maiores de TNF- $\alpha$  (0,1 – 1 fg/sítio) também terem sido capazes de aumentar o tempo de imobilidade no teste do nado forçado, efeito que foi prevenido pela administração de antidepressivos utilizados na clínica (fluoxetina, imipramina e desipramina). Em ratos, a administração crônica (via i.c.v.) de TNF- $\alpha$  também levou a um comportamento tipo depressivo (REYNOLDS *et al.*, 2004). Além disso, Kaster *et al.* (2012) demonstraram que o uso de inibidor da síntese de TNF- $\alpha$ , impediu o aumento no tempo de imobilidade induzido por essa citocina, reforçando a ideia de que o aumento de TNF- $\alpha$  no encéfalo de camundongos está relacionado com o comportamento tipo depressivo nesses animais. Corroborando com esses dados, estudos evidenciaram que camundongos sem receptores para o TNF- $\alpha$  apresentaram uma diminuição no tempo de imobilidade no teste de suspensão pela cauda e teste do nado forçado (SIMEN *et al.*, 2006; KASTER *et al.*, 2012); que camundongos sem o gene para TNF- $\alpha$  exibiram um menor tempo de imobilidade no TNF quando comparado com os animais que tinham o gene para o TNF- $\alpha$  (YAMADA *et al.*, 2000); e que um bloqueador do TNF- $\alpha$  levou a um comportamento tipo antidepressivo em um modelo animal de comportamento depressivo induzido por estresse de contenção

(KRÜGEL *et al.*, 2013). Além disso, também se sugere que a desipramina, um antidepressivo da classe dos tricíclicos, desempenha seu efeito tipo antidepressivo, pelo menos em parte, por diminuir os níveis de TNF- $\alpha$  (REYNOLDS *et al.*, 2004). Vale ressaltar que a produção de outras citocinas inflamatórias, como IL-1 e IL-2, motrou-se alterada em modelo animal de depressão induzido por estresse moderado crônico (KUBERA *et al.*, 1998).

Uma das hipóteses que se postula para justificar esse comportamento tipo depressivo induzido pelo TNF- $\alpha$  é que citocinas inflamatórias aumentam a atividade da enzima IDO, que como já mencionado, converte o triptofano em quinurenina, diminuindo a formação de serotonina, fato esse que pode deixar o indivíduo susceptível a desenvolver depressão (CRYAN; LEONARD, 2000; STONE; DARLINGTON, 2002; RUSSO *et al.*, 2009; LEONARD; MAES, 2012). Alguns estudos, como o realizado por Yamada e colaboradores (2000) e Raison *et al.* (2010) suportam essa hipótese. Yamada *et al.* (2000) demonstraram que camundongos sem o gene do TNF- $\alpha$  apresentavam maior quantidade de serotonina e de 5-hidroxi-indolacético, um metabólito da serotonina, em várias regiões cerebrais, incluindo o hipocampo, sugerindo que o metabolismo da serotonina está aumentado nos animais que não expressam o TNF- $\alpha$ . Já em humanos, foi demonstrado que pacientes com hepatite C tratados com citocina inflamatória, IFN- $\alpha$ , possuíam níveis maiores de quinurenina, ácido quinolínico e ácido quinurênico no líquido cefalorraquidiano, além de menores concentrações de triptofano plasmático. Além disso, o aumento de quinurenina e ácido quinolínico nesses pacientes foi correlacionado com um aumento nos sintomas depressivos (RAISON *et al.*, 2010). Corroborando com esses dados, a administração intravenosa de LPS em humanos saudáveis aumentou as citocinas inflamatórias além de agravar os sintomas depressivos segundo a escala de MADRS (DELLAGIOIA *et al.*, 2012).

Outro mecanismo pelo qual a inflamação poderia influenciar no metabolismo da serotonina e, por consequência, na depressão é através de modificação na expressão dos transportadores de serotonina. Estudo *in vitro* já demonstrou que citocinas inflamatórias, incluindo o TNF- $\alpha$  aumentaram a expressão dos transportadores de serotonina (ZHU; BLAKELY; HEWLETT, 2006). Como esses transportadores de serotonina fazem a recaptação da serotonina para o neurônio pré-sináptico, diminuindo seus níveis na fenda sináptica, o aumento nesses transportadores pode piorar a depressão enquanto que a inibição desses

transportadores pelos ISRS exerce um papel antidepressivo (BENMANSOUR *et al.*, 1999).

Em contrapartida às evidências que associam inflamação e depressão, um estudo comparando pacientes controle com pacientes depressivos não mostrou alterações plasmáticas na expressão do transportador da serotonina, no mRNA da enzima IDO e nem nas concentrações de quinurenina ou seus metabólitos entre os dois grupos da pesquisa, embora se observou um aumento plasmático em algumas citocinas inflamatórias (IL-6, IFN- $\gamma$  e PCR) e uma diminuição na concentração de triptofano nos pacientes com depressão (HUGHES *et al.*, 2012).

No presente estudo, não se observou alteração significativa no número de cruzamentos no TCA após a administração de TNF- $\alpha$ , demonstrando que o efeito dessa citocina não é devido a uma alteração locomotora dos animais. Após a administração aguda de TNF- $\alpha$  em camundongos (KASTER *et al.*, 2012) ou após comparar camundongos transgênicos que superexpressavam TNF- $\alpha$  no encéfalo com camundongos selvagens (FIORE *et al.*, 1996) também não foram demonstradas alterações no número de cruzamentos no TCA.

Ainda em relação à **Figura 12A**, observa-se que a administração via oral de  $\alpha$ -tocoferol nas três doses analisadas impediram o aumento de imobilidade causado pelo TNF- $\alpha$ , ou seja, a vitamina E na forma de  $\alpha$ -tocoferol desempenhou um efeito protetor, até mesmo na dose subativa, quando os animais receberam essa citocina inflamatória, sugerindo que a vitamina E pode agir, pelo menos em parte, como um anti-inflamatório, diminuindo a inflamação causada pelo TNF- $\alpha$  e consequentemente o comportamento tipo depressivo induzido por essa citocina. Além de ter papel antioxidante (BRIGELIUS-FLOHÉ; TRABER, 1999), os vários análogos da vitamina E também demonstram papel anti-inflamatório (GODBOUT *et al.*, 2005). Embora a forma tocotrienol parece ser a com maior capacidade anti-inflamatória, outras formas da vitamina E, como a  $\alpha$ -tocoferol e acetato de  $\alpha$ -tocoferil também demonstram diminuir a produção de citocinas inflamatórias, prostaglandina E2 e óxido nítrico induzido por LPS (NG; KO, 2012). Outros estudos também mostram que o tocoferol consegue diminuir a inflamação em diversas situações como em modelos animais de câncer (JU *et al.*, 2009; YANG *et al.*, 2010), em células de câncer de cólon (O'LEARY *et al.*, 2004) em monócitos humanos ativados (DEVARAJ; JIALAL, 1999) e em pacientes com diabetes mellitus tipo 2 (DEVARAJ; JIALAL, 2000). Vale ressaltar que, semelhante ao encontrado no presente estudo, outros autores já evidenciaram que doses

subativas de antidepressivos foram capazes de exercer efeito tipo antidepressivo quando os animais foram expostos a algum tipo de insulto como, por exemplo, animais submetidos ao estresse (POLESZAK *et al.*, 2006) ou a oligômeros  $\beta$ -amilóide (LEDO *et al.*, 2012), sugerindo uma maior sensibilidade de antidepressivos na presença de insultos.

Já está bem estabelecido o papel dos neurotransmissores monoaminérgicos (serotonina, noradrenalina e dopamina) na depressão (ELHWUEGI, 2004; MILLAN, 2004; ANDREWS *et al.*, 2011), bem como o envolvimento da neurotransmissão monoaminérgica na resposta tipo antidepressiva nos modelos animais de depressão (ELHWUEGI, 2004; YAMADA; SUGIMOTO; YAMADA, 2004). Sendo assim, este estudo investigou o possível envolvimento dos sistemas serotoninérgico, noradrenérgico e dopaminérgico no efeito tipo antidepressivo do  $\alpha$ -tocoferol em modelo animal de comportamento depressivo induzido pelo TNF- $\alpha$ . Os dados do presente estudo demonstram que em animais recebendo veículo ao invés de TNF- $\alpha$ , a associação de doses subativas de  $\alpha$ -tocoferol com fluoxetina, imipramina ou bupropiona (**Figuras 13A, 14A e 15A**) produziu um efeito sinérgico, diminuindo o tempo de imobilidade no TSC. Já em animais tratados com TNF- $\alpha$ , observou-se que doses subativas isoladas ou associadas de  $\alpha$ -tocoferol e/ou fluoxetina, imipramina ou bupropiona levaram a um comportamento tipo antidepressivo no TSC. Além disso, a associação do  $\alpha$ -tocoferol com bupropiona ou imipramina levou a um efeito aditivo no tempo de imobilidade no TSC em animais que receberam um insulto inflamatório. Como nenhum grupo apresentou alteração na locomoção no TCA (**Figuras 13B, 14B e 15B**), não se pode atribuir os resultados encontrados no TSC a alguma alteração locomotora dos animais. Assim, sugere-se que o efeito tipo antidepressivo do  $\alpha$ -tocoferol envolve, pelo menos em parte, a participação dos sistemas serotoninérgico, noradrenérgico e dopaminérgico.

Estudos realizados com ratos já demonstraram que a vitamina E pode interferir com os níveis de algumas monoaminas (CASTAÑO *et al.*, 1992; ADACHI; IZUMI; MITSUMA, 1999). Castaño e colaboradores (1992) mostraram que 15 dias de dieta deficiente em vitamina E levou a uma diminuição nos níveis de serotonina e aumento nos níveis de dopamina no encéfalo desses animais. Já no estudo realizado por Adachi, Izumi e Mitsuma (1999), uma dieta deficiente de vitamina E por 24 semanas levou a uma diminuição nos níveis de serotonina, dopamina e uma diminuição da atividade da enzima triptofano hidroxilase (que participa na formação da serotonina). Além

disso, semelhante ao encontrado com o  $\alpha$ -tocoferol no presente trabalho, outras vitaminas que também possuem atividade tipo antidepressiva em modelos animais, como o ácido ascórbico e o ácido fólico, também demonstram que seus efeitos comportamentais envolvem, pelo menos em parte, a participação do sistema monoaminérgico (BROCARD *et al.*, 2008; BINFARÉ *et al.*, 2009). Corroborando com esses dados, Lobato e colaboradores (2009) demonstraram um efeito sinérgico na diminuição do tempo de imobilidade no teste do nado forçado quando se associou  $\alpha$ -tocoferol e fluoxetina.

O sistema serotoninérgico foi o primeiro sistema associado com depressão (SCHILDKRAUT, 1965; ELHWUEGI, 2004). Como amplamente revisado (NORTHOFF, 2012), alterações em vários genes, incluindo genes envolvidos na regulação da serotonina, estão associadas com a presença de depressão. Corroborando com esses dados, a maioria dos antidepressivos utilizados na clínica regula a liberação encefálica de serotonina (KREISS; LUCKI, 1995), além de inibir a recaptação desse neurotransmissor e interagir com seus receptores (CRYAN; MOMBÉREAU; VASSOUT, 2005). Consistente com a hipótese monoaminérgica, alguns estudos mostraram que a neurotransmissão serotoninérgica afeta a neurotransmissão noradrenérgica e vice-versa, demonstrando a existência de uma relação entre a serotonina e a noradrenalina no SNC (GORMAN; SULLIVAN, 2000; SZABO; BLIER, 2001), sendo que uma modificação nessa interação foi observada após análises do líquido cefalorraquidiano de pacientes com depressão (GERACIOTI *et al.*, 1997). Além disso, os sistemas noradrenérgico e dopaminérgico, por si só, estão implicados na fisiopatologia da depressão, bem como no mecanismo de ação de antidepressivos (NUTT, 2006; EL MANSARI *et al.*, 2010). Isso pode ser evidenciado, por exemplo, pelo fato de que drogas que depletam ou inibem a síntese das catecolaminas (noradrenalina, dopamina e adrenalina) levam a uma piora do humor e que inibidores da enzima MAO, cujo efeito é aumentar a disponibilidade das monoaminas – incluindo as catecolaminas – na fenda sináptica exibem um efeito antidepressivo (SCHILDKRAUT, 1965; MILLER *et al.*, 1996; PÁEZ-PEREDA, 2005; EL MANSARI *et al.*, 2010).

Corroborando com esses dados que associam o efeito do  $\alpha$ -tocoferol com o sistema monoaminérgico, trabalho pré-clínico demonstrou que o pré-tratamento com inibidor da síntese de serotonina e com antagonistas  $\alpha_1$ - e  $\alpha_2$ -adrenérgicos (subtipos de receptores para a noradrenalina), preveniu o efeito tipo antidepressivo do  $\alpha$ -tocoferol no teste do nado forçado (LOBATO, 2009).

A fluoxetina (ISRS), a imipramina (antidepressivo tricíclico) e a bupropiona (inibidor seletivo da recaptação de noradrenalina e de dopamina) são alguns dos antidepressivos comumente utilizados na prática clínica para tratar pacientes com depressão (HOLTZHEIMER; NEMEROFF, 2006; WILKES, 2006; VON WOLFF *et al.*, 2012). Entretanto, em muitos pacientes, o tratamento com esses antidepressivos não é muito eficaz e apresenta vários efeitos colaterais (NEMEROFF; OWENS, 2002; BERTON; NESTLER, 2006). Sendo assim, o efeito tipo antidepressivo sinérgico do  $\alpha$ -tocoferol com esses antidepressivos, inclusive quando existe um insulto inflamatório, sugere que essa vitamina pode ser interessante para otimizar a farmacoterapia convencional e, quem sabe, até possibilitar uma diminuição nas doses dos antidepressivos prescritos. Entretanto, estudos complementares pré-clínicos e clínicos são necessários para melhor elucidar esse efeito.

O sistema glutamatérgico também tem demonstrado envolvimento em alguns distúrbios psiquiátricos, incluindo a depressão (FRYE *et al.*, 2007; ZARATE *et al.*, 2010). Dessa forma, se avaliou se o  $\alpha$ -tocoferol em dose subativa age de maneira sinérgica com dose subativa do MK-801 (antagonista do receptor NMDA). Como pode ser observado na **Figura 16A**, a somação de  $\alpha$ -tocoferol com MK-801 agiu de forma sinérgica em animais que receberam apenas veículo (ao invés de TNF- $\alpha$ ), levando a um comportamento tipo antidepressivo nesses animais. Já nos animais que receberam TNF- $\alpha$ , doses subativas de  $\alpha$ -tocoferol e de MK-801, isoladas ou em associação impediram o comportamento depressivo induzido pelo TNF- $\alpha$  de maneira similar, demonstrando que com a presença de um insulto inflamatório, doses de vitamina E e de antagonista do receptor NMDA que não faziam efeito, passaram a exibir um efeito tipo antidepressivo. Além disso, os dados sugerem que o efeito tipo depressivo do TNF- $\alpha$  parece depender, pelo menos em parte, da ativação de receptores NMDA. Vale ressaltar que nenhum dos grupos teve alteração na atividade locomotora (**Figura 16B**).

Embora a transmissão glutamatérgica seja importante para várias funções do SNC, a ativação excessiva dos receptores NMDA, um dos tipos de receptor ionotrópico de glutamato, é associada com processos neurotóxicos presentes em doenças neuropsiquiátricas (KORNHUBER; WELLER, 1997). Como já mencionado, citocinas inflamatórias aumentam a atividade da enzima IDO e, por consequência, aumentam a produção de ácido quinolínico, que é um agonista NMDA (MYINT; SCHWARZ; MÜLLER, 2012). Isso pode justificar a hipótese de que o efeito comportamental do TNF- $\alpha$  seja devido, pelo menos em parte, a



um aumento na atividade dos receptores NMDA, já que, no presente estudo, o pré-tratamento com o antagonista de receptores NMDA preveniu o efeito tipo depressivo induzido pelo TNF- $\alpha$ .

Aliado a esse contexto, vários estudos já demonstraram que antagonistas do receptor NMDA exerceram efeito tipo antidepressivo em modelos animais de depressão (RADA *et al.*, 2003; DHIR; KULKARNI, 2008; LI *et al.*, 2011). Estudos em humanos também mostraram que antagonistas do receptor NMDA levaram a uma diminuição nos sintomas depressivos (ZARATE Jr *et al.*, 2006; DIAZGRANADOS *et al.*, 2010). Semelhante ao ocorreu no presente estudo, outros autores também demonstraram que a associação de doses subativas de antagonistas NMDA com doses subativas de compostos ou fármacos que possuem atividade (tipo) antidepressiva levou a uma diminuição no tempo de imobilidade dos animais no TSC e TNF (ROGÓZ *et al.*, 2002; MORETTI *et al.*, 2011; BETTIO *et al.*, 2012). Além disso, estudo pré-clínico já evidenciou que o MK-801 estimulou a liberação de serotonina e dopamina (CASTAÑE; ARTIGAS; BORTOLOZZI, 2008), o que também contribui para a ação antidepressiva desse composto.

No presente trabalho, foi demonstrado que o  $\alpha$ -tocoferol consegue agir de modo sinérgico com o antagonista de receptores NMDA, MK-801, sugerindo que essa vitamina pode se correlacionar com o neurotransmissor glutamato. Em 2008, foi visto que  $\alpha$ -tocoferol aumentou a liberação de glutamato dependente de cálcio em terminais glutamatérgicos cerebrocorticais de ratos (YANG; WANG, 2008). Em contrapartida, células tratadas com glutamato apresentaram aumento na concentração de cálcio intracelular, dano no DNA, aumento na produção de espécies reativas de oxigênio e dano mitocondrial, fatos esses que foram prevenidos pelo tratamento com  $\alpha$ -tocoferol 5 minutos antes do tratamento com glutamato (TIROSH *et al.*, 2000). O  $\alpha$ -tocoferol também foi efetivo em diminuir o cálcio intracelular de sinaptossomas de encéfalo de ratos controle ou tratados com glutamato (AVROVA *et al.*, 1999). Outro estudo mais recente (KHANNA *et al.*, 2010) evidenciou que o  $\alpha$ -tocotrienol impediu a ativação da enzima fosfolipase A2 causada pelo glutamato, enzima essa que aumenta a liberação de ácido aracdônico que, posteriormente, pode formar leucotrienos, tromboxanos e prostaglandinas de séries inflamatórias (CHANG; MUSSER; MCGREGOR, 1987). Além disso, outro trabalho mostrou que o  $\alpha$ -tocotrienol, por impedir algumas consequências da ação do glutamato, levou a uma neuroproteção em células hipocampais de camundongos (KHANNA *et al.*, 2010). Corroborando com esses dados

que associam o efeito do  $\alpha$ -tocoferol com o sistema glutamatérgico, trabalho pré-clínico demonstrou que o pré-tratamento com NMDA (agonista de receptores NMDA) ou com D-serina (co-agonista de receptores NMDA), preveniu o efeito tipo antidepressivo do  $\alpha$ -tocoferol no teste do nado forçado, o que mostra que a ativação desses canais impede que o  $\alpha$ -tocoferol exerça seu efeito (LOBATO, 2009).

Levando em consideração que o influxo de cálcio ocasionado pelo estímulo dos receptores NMDA leva a ativação da enzima NOS (STEINERT; CHERNOVA; FORSYTHE, 2010), o presente estudo avaliou se a inibição da NOS neuronal, realizada através da administração de 7-nitroindazol, influencia no efeito tipo antidepressivo do  $\alpha$ -tocoferol. Como demonstrado na **Figura 17A**, a associação de doses subativas de  $\alpha$ -tocoferol com 7-nitroindazol levou a um efeito tipo antidepressivo em animais que não receberam TNF- $\alpha$ , enquanto que doses isoladas desses dois compostos não obtiveram efeito. Nos animais que receberam TNF- $\alpha$ , o  $\alpha$ -tocoferol e o 7-nitroindazol em doses subativas passaram a exercer efeito tipo antidepressivo quando administrados isoladamente, sugerindo que o efeito tipo depressivo do TNF- $\alpha$  parece depender, pelo menos em parte, do aumento de NO no encéfalo. Além disso, quando associados,  $\alpha$ -tocoferol e 7-nitroindazol potencializaram a diminuição do tempo de imobilidade no TSC quando comparado com os grupos que receberam apenas uma das duas substâncias, sugerindo um efeito aditivo entre a vitamina E e o inibidor da nNOS. Vale destacar que nenhum dos grupos teve sua atividade locomotora alterada (**Figura 17B**).

Apesar de o NO ter importantes funções para o encéfalo, o NO é um radical livre, que, quando em excesso, pode levar a danos oxidativos à célula e a uma excitotoxicidade, que está relacionada tanto com a diminuição da captação de glutamato pelos astrócitos quanto com o aumento na ativação de receptores NMDA (STRIJBOS; LEACH; GARTHWAITE, 1996; HABIB; ALI, 2011). Além disso, o excesso de NO também parece estar associado com a depressão (STRIJBOS; LEACH; GARTHWAITE, 1996; DHIR; KULKARNI, 2011). Estudos em humanos demonstram, inclusive, que pacientes com tentativas suicidas tem níveis mais elevados de NO plasmático (KIM *et al.*, 2006). Vale ressaltar que a ativação da microglia em condições inflamatórias pode levar a um aumento na produção de NO (LIU *et al.*, 2002; LIU; HONG, 2003), o que pode justificar a hipótese de que o efeito comportamental do TNF- $\alpha$  seja devido, pelo menos em parte, a um aumento na produção de NO, já que, no presente estudo, o pré-

tratamento com inibidor da nNOS preveniu o efeito tipo depressivo induzido pelo TNF- $\alpha$ .

Aliado a esse contexto, o uso de substâncias que inibem as enzimas responsáveis pela produção do NO, as NOS, poderia trazer benefícios na depressão. Adicionalmente, a substância utilizada no presente trabalho, 7-nitroindazol, que é um inibidor preferencial para a nNOS, apresenta atividade tipo antidepressiva em modelos animais (YILDIZ *et al.*, 2000; JOCA; GUIMARÃES, 2006). É importante ressaltar que além de o  $\alpha$ -tocoferol ter mostrado, no presente estudo, que sua propriedade tipo antidepressiva parece envolver, pelo menos em parte, a via da L-arginina-NO, outros compostos que também possuem atividade antidepressiva demonstraram ter seu efeito impedido após o aumento nos níveis de NO ou seu efeito potencializado após a diminuição do NO (BROCARD *et al.*, 2008; GHASEMI *et al.*, 2009; MORETTI *et al.*, 2011; BETTIO *et al.*, 2012).

Alguns trabalhos também relacionam a vitamina E com a via da L-arginina-NO. Embora alguns trabalhos tenham associado os efeitos benéficos do  $\alpha$ -tocoferol a um aumento na atividade da NOS, aumentando a produção de NO (LI *et al.*, 2001; HELLER; WERNER-FELMAYER; WERNER, 2004; TRONCHINI; DE MIRANDA NETO; ZANONI, 2010), esses estudos envolveram apenas ações periféricas da vitamina E, sendo que nenhum deles avaliou questões relacionadas ao SNC e a nNOS, especificamente. Já em estudo pré-clínico utilizando modelo preditivo de depressão, foi demonstrado que o pré-tratamento com o aminoácido precursor de NO, L-arginina, ou com SNAP, um doador de NO, preveniu significativamente o efeito tipo antidepressivo do  $\alpha$ -tocoferol no teste do nado forçado, sugerindo que o efeito tipo antidepressivo da vitamina E pode ser dependente, pelo menos em parte, da inibição da síntese de NO (LOBATO, 2009).

Nessa primeira parte do trabalho, os resultados comportamentais sugerem que um insulto inflamatório com TNF- $\alpha$  leva a um comportamento depressivo, que pode ser mediado, pelo menos em parte, pela ativação de receptores NMDA e pelo aumento no NO. Além disso, os dados demonstram que o  $\alpha$ -tocoferol apresenta um efeito tipo antidepressivo no TSC, que pode ser mediado, pelo menos em parte, pelos sistemas monoaminérgico, glutamatérgico (através de receptores NMDA) e pela via da L-arginina-NO. Vale ressaltar que o TSC não é um modelo de depressão *per se*, sendo assim, os resultados obtidos nesse modelo devem ser interpretados com cautela. Entretanto, destaca-se que o modelo do TNF- $\alpha$  apresenta validade de face, já que em estudo anterior foi demonstrado que ele ocasiona anedonia (KASTER *et al.*,

2012), sintoma presente em indivíduos depressivos e, de certa forma, o modelo também possui validade de constructo, já que por ser uma citocina pró-inflamatória, ele tem a capacidade de alterar vias metabólicas que também estão alteradas em pacientes com depressão. Dessa forma, os dados desse estudo podem servir como alicerce para a realização de estudos animais complementares bem como estudos clínicos a fim de confirmar o efeito tipo antidepressivo da vitamina E, incluindo em situações que existe a presença de inflamação.

Após a obtenção dos resultados até agora discutidos, objetivou-se avaliar se o modelo animal de comportamento depressivo induzido pelo TNF- $\alpha$  levaria a alguma alteração no imunoconteúdo ou fosforilação de proteínas envolvidas com vias apoptóticas, bem como investigar se o  $\alpha$ -tocoferol conseguiria alterar alguma possível resposta. Para realizar as análises bioquímicas, utilizou-se o hipocampo dos camundongos. O hipocampo é uma região cerebral associada com o controle da memória e do aprendizado (DUMAN 2004; IZQUIERDO *et al.*, 2008). Além disso, ele é umas das estruturas límbicas que tem sido extensivamente estudada em indivíduos com depressão e, pelo fato de seu volume estar reduzido em pacientes com esse distúrbio psiquiátrico, sugere-se que o hipocampo pode contribuir para alguns dos sintomas dessa doença psiquiátrica (DUMAN 2004; SAHAY; HEN, 2007).

As proteínas avaliadas no presente trabalho são proteínas relacionadas com vias apoptóticas, como Bax, Bcl2 e GSK-3 $\beta$ . A morte neuronal é um evento que está presente tanto na presença de depressão quanto na presença de inflamação (SHELIN; GADO; KRAEMER, 2003; VIVIANI *et al.*, 2004; PATEL *et al.*, 2006; COLE *et al.*, 2010). *In vitro*, a utilização de IFN- $\gamma$  levou a um aumento na expressão do mRNA da BAX e diminuição na expressão do mRNA da Bcl2 (NING *et al.*, 2010). Em outro estudo, após a utilização de um modelo animal de isquemia e reperfusão cerebral – modelo que está relacionado com inflamação – foi demonstrado que ocorreu um aumento de citocinas inflamatórias como TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , além de um maior nível de Bax e menor de Bcl2 (GU *et al.*, 2012). De forma semelhante, uma recente revisão correlacionou vários modelos animais (ex: estresse moderado crônico e desamparo aprendido) com comportamento tipo depressivo, aumento de inflamação e alteração em vias apoptóticas com diminuição de Bcl2 (KUBERA *et al.*, 2011).

GSK-3 $\beta$  também está relacionada com a inflamação e depressão (MARTIN *et al.*, 2005; RODIONOVA *et al.*, 2007; MAES *et al.*, 2012). Em geral, a ativação da GSK-3 $\beta$  exerce efeito pró-apoptótico, enquanto que a inibição dessa proteína está geralmente associada a efeito

antiapoptótico (PICCHINI; MANJI; GOULD, 2004). Além disso, a administração de inibidores da GSK-3 $\beta$  em ratos ou camundongos produz um efeito tipo antidepressivo no teste do nado forçado (GOULD *et al.*, 2004; ROSA *et al.*, 2008). Em relação à inflamação, estudo *in vitro* mostrou que a incubação com TNF- $\alpha$  por 24 horas em cultura de macrófagos humanos aumentou a expressão nuclear de GSK-3 $\beta$  (PARK *et al.*, 2011). Já em cardiomiócitos, LPS levou a um aumento na expressão de TNF- $\alpha$  e uma diminuição na fosforilação da GSK-3 $\beta$  nos resíduos de serina 9 (SHEN; FAN; PENG, 2008). Em contrapartida, o estudo também demonstrou que a super-expressão de GSK-3 $\beta$  atenuou a expressão de TNF- $\alpha$  induzido pelo LPS (SHEN; FAN; PENG, 2008). Além disso, já foi evidenciado que a deficiência de GSK-3 suprimiu a resposta inflamatória induzida por LPS (MARTIN *et al.*, 2005).

Entretanto, no presente trabalho, o insulto inflamatório com TNF- $\alpha$ , em dose que consegue levar a um comportamento tipo depressivo nos animais, não foi suficiente para alterar o imunoconteúdo de Bax e Bcl2 (**Figura 18**) e nem a fosforilação da GSK-3 $\beta$  (Ser9) (**Figura 19**). Um estudo recente realizado pelo nosso grupo mostrou que o estresse agudo por contenção induziu um comportamento tipo depressivo e aumentou o estresse oxidativo no encéfalo de camundongos (MORETTI *et al.*, 2012a), fato esse que pode resultar em inflamação mediada por neutrófilos (JUURLINK; PATERSON, 1998). Moretti *et al.* (2012a) não observaram efeitos do estresse sobre a fosforilação de GSK-3 $\beta$  (Ser9) ou a quantidade de BAX, enquanto que o nível aumentado de Bcl2 foi relatado (MORETTI *et al.*, 2012a), resultados que são, em parte, semelhantes aos encontrados no presente estudo. Já em cultura de osteoclastos humanos, nem o TNF- $\alpha$ , nem a IL-1 $\beta$  foram capazes de alterar os níveis de Bcl2 (TSUBOI *et al.*, 1999). Sendo assim, os dados do estudo sugerem que a presença, por 30 minutos, de dose pequena de TNF- $\alpha$  (0,001 fg/sítio) no SNC de animais não é suficiente para levar a alguma alteração em proteínas envolvidas com apoptose. Contudo, mais estudos são necessários para investigar se uma dose maior ou se um tratamento crônico com TNF- $\alpha$  poderia levar a alterações em proteínas como Bax, Bcl2 e GSK-3 $\beta$ .

O presente trabalho também não demonstrou nenhum efeito do  $\alpha$ -tocoferol, em nenhuma das doses testadas, sobre o imunoconteúdo de Bax e Bcl2 ou sobre a fosforilação da GSK-3 $\beta$  (Ser9). Embora os nossos resultados não tenham mostrado nenhuma alteração nessas proteínas, alguns estudos da literatura mostram que a vitamina E pode alterar Bax e/ou Bcl2. Em neurônios corticais de ratos, o  $\alpha$ -tocoferol impediu a morte celular induzida por peróxido de hidrogênio, além de aumentar a

expressão de Bcl2 via proteína cinase ativada por mitógeno (MAPK) e fosfatidilinositol 3-cinase (PI3K) (NUMAKAWA *et al.*, 2006). *In vivo*, a suplementação por 14 semanas com vitamina E ( $\alpha$ -tocoferil succinato) e ácido  $\alpha$ -lipóico levou a um aumento na expressão da Bcl2 nas células endoteliais de animais, embora os níveis de Bax não tenham sofrido nenhuma modificação (MARSH *et al.*, 2005). Em contrapartida, ratos ingerindo uma dieta deficiente em vitamina E por 5 semanas tiveram um aumento nos níveis de Bax em células alveolares do tipo II, sugerindo que a deficiência dessa vitamina aumenta proteínas apoptóticas em células pulmonares, embora não tenha alterado os níveis de Bcl2 (SINHA *et al.*, 2002). Ainda em ratos, o tratamento com  $\alpha$ -tocoferol impediu o aumento da relação Bax:Bcl2 no hipocampo e no núcleo caudado induzido por haloperidol – uma medicação utilizada para tratar transtornos psicóticos (POST *et al.*, 2001). Em outro estudo, após ratos terem passado por 6 horas de estresse de contenção por 5 dias consecutivos observou-se um aumento nos níveis de Bax em células germinativas, que foi prevenido quando os animais foram tratados com  $\alpha$ -tocoferol durante esse mesmo período (KUKNER *et al.*, 2010). Outros autores demonstraram que o  $\alpha$ -tocoferol foi capaz de impedir as alterações na Bax e Bcl2 ocasionadas pela hipóxia em músculo esquelético de camundongos, além de melhorar a integridade mitocondrial (MAGALHÃES *et al.*, 2007). Vale ressaltar, que nenhum desses estudos foram realizados no mesmo protocolo experimental do presente estudo, podendo justificar, em parte, as diferenças nos resultados.

A vitamina E também parece interagir com a GSK-3. Um estudo *in vitro*, com células de mastocitoma, evidenciou que o  $\alpha$ -tocoferol levou a uma diminuição da Akt, que por sua vez diminuiu a fosforilação das formas  $\alpha$  e  $\beta$  da GSK-3 (KEMPNA *et al.*, 2004). O  $\alpha$ -tocoferol também inibiu a desfosforilação da GSK-3 $\beta$  em oligodendrócitos tratados com 7-ketocolesterol (que induz a apoptose) (RAGOT *et al.*, 2011). Em células epiteliais malignas,  $\gamma$ -tocotrienol induziu uma diminuição de algumas proteínas, incluindo a GSK-3 $\alpha/\beta$  (SHAH; SYLVESTER, 2004; SHAH; SYLVESTER, 2005; SYLVESTER; SHAH; SAMANT, 2005). Tocotrienóis também diminuíram a expressão de GSK-3 $\beta$  de células cancerosas pancreáticas (SHIN-KANG *et al.*, 2011). Acredita-se que essa diferença entre os resultados obtidos no presente estudo e com o que mostra a literatura seja resultante do tempo de tratamento com  $\alpha$ -tocoferol e TNF- $\alpha$ , sugerindo que o tempo utilizado no presente trabalho não tenha sido suficiente para influenciar algumas proteínas envolvidas com apoptose, principalmente no caso da

Bax e Bcl2 e, que talvez, tenha sido um tempo excessivo para se avaliar a fosforilação de GSK-3 $\beta$ , já que a fosforilação e desfosforilação são efeitos dinâmicos e que podem ocorrer em um curto espaço de tempo. Entretanto, mais estudos são necessários para averiguar se o tratamento com a vitamina E conseguiria alterar proteínas apoptóticas em tempos diferentes do tempo analisado e em camundongos submetidos a um modelo de comportamento depressivo que modifique esse parâmetro, por exemplo, o estresse crônico imprevisível. Vale ressaltar que o tratamento agudo com ácido ascórbico, outra vitamina que também possui efeitos tipo antidepressivos, também não foi capaz de alterar os níveis de Bax ou a fosforilação da GSK-3 $\beta$ , embora tenha aumentado a Bcl2 em hipocampo de camundongos submetidos a 7 h de estresse de contenção (MORETTI *et al.*, 2012a).

É interessante comentar que algumas substâncias com propriedades anti-inflamatórias e/ou antidepressivas influenciam na quantidade de Bax, Bcl2 e GSK-3, por exemplo: a) Quando animais foram tratados com um terpeno anti-inflamatório presente no *Ginkgo biloba* ocorreu uma proteção contra os efeitos apoptóticos induzido pelo modelo de isquemia e reperfusão, sendo capaz de diminuir Bax e aumentar Bcl2 (GU *et al.*, 2012); b) Curcumina protegeu cultura de neurônios de ratos contra a citotoxicidade induzida pela  $\beta$ -amiloide, aumentando a expressão da proteína antiapoptótica Bcl2 e diminuindo a proteína apoptótica caspase 3 (QIN *et al.*, 2009); c) N-acetilcisteína impediu, em cultura de células mesangiais, a diminuição da fosforilação da GSK-3 $\beta$  (Ser9) induzida pelo cádmio (WANG *et al.*, 2009).

Corroborando com esses dados, já foi demonstrado que a fluoxetina (ISRS) aumentou a proliferação celular no hipocampo de ratos, aumentou a expressão de Bcl2, preveniu a morte celular induzida por LPS e inibiu o aumento de citocinas inflamatórias induzida pelo LPS (CHIOU *et al.*, 2006). Em outro estudo, o tratamento com fluoxetina por 7 dias em cultura de células tronco neurais levou a um aumento na expressão de Bcl2, além de facilitar a sobrevivência e diferenciação dessas células (CHEN *et al.*, 2007). A desipramina, antidepressivo tricíclico, também aumentou os níveis de Bcl2 em cultura de células tronco neuronais, além de prevenir a morte celular induzida pelo LPS (HUANG *et al.*, 2007) e, em animais, o tratamento por 3 semanas com desipramina impediu a morte neuronal induzida pelo estresse crônico imprevisível (BACHIS *et al.*, 2008). Também já foi demonstrado que o tratamento por 14 dias com citalopram (ISRS), imipramina (antidepressivo tricíclico) ou amitriptilina (antidepressivo tricíclico) aumentou a expressão de Bcl2 no hipocampo de

camundongos, embora o tratamento agudo com esses antidepressivos não tenha proporcionado nenhuma mudança significativa nos níveis de Bcl2 (MURRAY; HUTSON, 2007). Em animais, também foi demonstrado que a atividade serotoninérgica regulou a fosforilação da GSK-3 $\beta$ , e que a administração de fluoxetina e imipramina aumentou a fosforilação da GSK-3 $\beta$  (Ser9) (LI *et al.*, 2004). Outro recente estudo demonstrou que a propriedade anti-inflamatória da fluoxetina é dependente do aumento da fosforilação da GSK-3 $\beta$  (SU *et al.*, 2012) e que a inibição da GSK-3 $\beta$  aliviou os efeitos aberrantes causados pela deficiência de serotonina (BEAULIEU *et al.*, 2008). Embora esses estudos sugiram o envolvimento de antidepressivos utilizados na clínica com vias apoptóticas e proteínas como Bax, Bcl2 e GSK-3, o presente estudo não mostrou alteração no imunoconteúdo ou fosforilação em nenhuma dessas três proteínas após a administração de bupropiona (inibidor da recaptação de dopamina e noradrenalina) em animais com TNF- $\alpha$  ou animais controle. Essa diferença de resultado pode ser devido à classe de antidepressivo utilizada do presente trabalho, que difere dos estudos acima comentados, ou por um possível tempo insuficiente entre a administração da substância e a decapitação do animal para o antidepressivo exercer alguma alteração bioquímica.

Assim, nessa segunda parte do trabalho, os resultados bioquímicos demonstraram que 30 minutos de insulto inflamatório não foram suficientes para alterar o imunoconteúdo ou fosforilação de proteínas envolvidas na apoptose no hipocampo de camundongos. De modo semelhante, a administração de  $\alpha$ -tocoferol em duas doses diferentes (10 e 30 mg/kg) ou de bupropiona na dose ativa 1 hora antes da decapitação também não levou a nenhuma alteração no imunoconteúdo de Bax, Bcl2 ou na fosforilação de GSK-3 $\beta$ . Dessa forma, sugere-se que os efeitos comportamentais do TNF- $\alpha$  e do  $\alpha$ -tocoferol, no presente trabalho, não foram mediados por alteração nas vias de apoptose, mas não podemos excluir a possibilidade de que o imunoconteúdo ou fosforilação destas proteínas sejam alterados após um intervalo de tempo diferente.



## 7 CONCLUSÃO

A administração de TNF- $\alpha$  levou a um comportamento tipo depressivo em camundongos expostos ao TSC, efeito que pode ser mediado, pelo menos em parte, pela ativação de receptores NMDA e pelo aumento de NO. Além disso, o pré-tratamento com  $\alpha$ -tocoferol em diferentes doses preveniu o efeito tipo depressivo do TNF- $\alpha$ , sendo que um efeito tipo antidepressivo sinérgico do  $\alpha$ -tocoferol com antidepressivos foi observado em animais controle ou expostos a um insulto inflamatório. Assim, o presente estudo sugere que  $\alpha$ -tocoferol pode ser interessante para prevenir o aparecimento da depressão e/ou para otimizar a farmacoterapia convencional da depressão, aumentando a eficácia de compostos antidepressivos utilizados na clínica, auxiliando no tratamento de pacientes resistentes ao tratamento com os antidepressivos clássicos ou com efeitos colaterais intoleráveis, ou ainda em casos de estados depressivos associados com condições inflamatórias. No entanto, mais estudos pré-clínicos e clínicos são necessários para melhor elucidar este efeito.

Este estudo também demonstrou que animais tratados com TNF- $\alpha$ , associado ou não ao  $\alpha$ -tocoferol em diferentes doses não tiveram alterações hipocampais no imunoconteúdo das proteínas Bax, Bcl2 ou na fosforilação da GSK-3 $\beta$  (Ser9). Dessa forma, sugere-se que os efeitos comportamentais do TNF- $\alpha$  e do  $\alpha$ -tocoferol observados no presente trabalho, não foram mediados por alteração nas vias de apoptose avaliadas. Entretanto, não se pode excluir a possibilidade de que o imunoconteúdo ou fosforilação dessas proteínas sejam alterados em outro intervalo de tempo.



## PERSPECTIVAS

- Avaliar com mais detalhes o envolvimento do  $\alpha$ -tocoferol em um modelo animal de depressão induzido pelo TNF- $\alpha$  com os sistemas monoaminérgicos, glutamatérgico e via da L-arginina-NO com o uso de agonistas e antagonistas de receptores específicos para serotonina, noradrenalina, dopamina, glutamato e com precursor ou inibidor da síntese de NO.

- Verificar o efeito crônico do tratamento com  $\alpha$ -tocoferol em outros modelos animais de comportamento tipo depressivo sobre a expressão de proteínas relacionadas com apoptose.

- Investigar o envolvimento de outras proteínas de sinalização intracelular no efeito tipo antidepressivo do  $\alpha$ -tocoferol em um modelo animal de comportamento depressivo induzido pelo TNF- $\alpha$  como Akt, ERK, PKC, MAPK, PI3K.

- Pesquisar os níveis de citocinas inflamatórias como IL-6 e IL-1, bem como fatores de transcrição associados à inflamação (como o NF- $\kappa$ B) em animais tratados com TNF- $\alpha$  e  $\alpha$ -tocoferol.



## REFERÊNCIAS

ABDEL-SALAM, O. M.; BAIUOMY, A. R.; ARBID, M. S. Studies on the anti-inflammatory effect of fluoxetine in the rat. *Pharmacological Research*, v. 49, n. 2, p. 119–131, fev. 2004.

ADACHI, K.; IZUMI, M.; MITSUMA, T. Effect of vitamin E deficiency on rat brain monoamine metabolism. *Neurochemical research*, v. 24, n. 10, p. 1307–1311, out. 1999.

AMERICAN PSYCHIATRY ASSOCIATION. *Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders*. 4. ed. Washington, DC: [s.n.], 1994.

ANACKER, C. *et al.* Antidepressants increase human hippocampal neurogenesis by activating the glucocorticoid receptor. *Molecular Psychiatry*, v. 16, n. 7, p. 738–750, jul. 2011.

ANDREWS, P. W. *et al.* Blue Again: Perturbational Effects of Antidepressants Suggest Monoaminergic Homeostasis in Major Depression. *Frontiers in Psychology*, v. 2, jul. 2011.

ANISMAN, H.; MERALI, Z.; HAYLEY, S. Neurotransmitter, peptide and cytokine processes in relation to depressive disorder: Comorbidity between depression and neurodegenerative disorders. *Progress in Neurobiology*, v. 85, n. 1, p. 1–74, maio 2008.

ANTONIOLI, M.; RYBKA, J.; CARVALHO, L. A. Neuroimmune endocrine effects of antidepressants. *Neuropsychiatric disease and treatment*, v. 8, p. 65–83, fev. 2012.

ANTONSSON, B. Bax and other pro-apoptotic Bcl-2 family “killer-proteins” and their victim the mitochondrion. *Cell and tissue research*, v. 306, n. 3, p. 347–361, dez. 2001.

ARTIGAS, F. Serotonin receptors involved in antidepressant effects. *Pharmacology & therapeutics*, set. 2012.

AVROVA, N. F. *et al.* The Difference in the Effect of Glutamate and NO Synthase Inhibitor on Free Calcium Concentration and Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup> -

ATPase Activity in Synaptosomes from Various Brain Regions. *Neurochemical Research*, v. 24, n. 9, p. 1101–1106, 1999.

BACHIS, A. *et al.* Chronic unpredictable stress promotes neuronal apoptosis in the cerebral cortex. *Neuroscience letters*, v. 442, n. 2, p. 104–108, set. 2008.

BAUD, V.; KARIN, M. Signal transduction by tumor necrosis factor and its relatives. *Trends in cell biology*, v. 11, n. 9, p. 372–377, set. 2001.

BEAULIEU, J.-M. *et al.* Role of GSK3 beta in behavioral abnormalities induced by serotonin deficiency. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v. 105, n. 4, p. 1333–1338, jan. 2008.

BEAULIEU, J.-M.; GAINETDINOV, R.R.; CARON, M.G. Akt/GSK3 Signaling in the Action of Psychotropic Drugs. *The Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, v. 49, p. 327–347, 2009.

BEHR, G. A.; MOREIRA, J. C. F.; FREY, B. N. Preclinical and clinical evidence of antioxidant effects of antidepressant agents: implications for the pathophysiology of major depressive disorder. *Oxidative medicine and cellular longevity*, v. 2012, 2012.

BENMANSOUR, S. *et al.* Effects of Chronic Antidepressant Treatments on Serotonin Transporter Function, Density, and mRNA Level. *The Journal of Neuroscience*, v. 19, n. 23, p. 10494–10501, jan. 1999.

BENMANSOUR, S. *et al.* Regulation of the norepinephrine transporter by chronic administration of antidepressants. *Biological psychiatry*, v. 55, n. 3, p. 313–316, fev. 2004.

BERG, B. M. *et al.* Alpha-tocopherol attenuates lipopolysaccharide-induced sickness behavior in mice. *Brain, behavior, and immunity*, v. 18, n. 2, p. 149–157, mar. 2004.

BERTON, O.; NESTLER, E. J. New approaches to antidepressant drug discovery: beyond monoamines. *Nature Reviews. Neuroscience*, v. 7, n. 2, p. 137–151, fev. 2006.

BETTIO, L. E. B. *et al.* Guanosine produces an antidepressant-like effect through the modulation of NMDA receptors, nitric oxide-cGMP and PI3K/mTOR pathways. *Behavioural brain research*, v. 234, n. 2, p. 137–148, out. 2012.

BEUREL, E.; JOPE, R. S. The paradoxical pro- and anti-apoptotic actions of GSK3 in the intrinsic and extrinsic apoptosis signaling pathways. *Progress in neurobiology*, v. 79, n. 4, p. 173–189, jul. 2006.

BILICI, M. *et al.* Antioxidative enzyme activities and lipid peroxidation in major depression: alterations by antidepressant treatments. *Journal of Affective Disorders*, v. 64, n. 1, p. 43–51, abr. 2001.

BINFARÉ, R. W. *et al.* Ascorbic acid administration produces an antidepressant-like effect: evidence for the involvement of monoaminergic neurotransmission. *Progress in Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry*, v. 33, n. 3, p. 530–540, abr. 2009.

BONACCORSO, S. *et al.* Immunotherapy with interferon-alpha in patients affected by chronic hepatitis C induces an intercorrelated stimulation of the cytokine network and an increase in depressive and anxiety symptoms. *Psychiatry research*, v. 105, n. 1-2, p. 45–55, dez. 2001.

BORNER, C. The Bcl-2 protein family: sensors and checkpoints for life-or-death decisions. *Molecular immunology*, v. 39, n. 11, p. 615–647, jan. 2003.

BORSINI, F.; MELI, A. Is the forced swimming test a suitable model for revealing antidepressant activity? *Psychopharmacology*, v. 94, n. 2, p. 147–160, 1988.

BOURIN, M.; MASSE, F.; HASCOËT, M. Evidence for the activity of lamotrigine at 5-HT<sub>1A</sub> receptors in the mouse forced swimming test. *Journal of Psychiatry and Neuroscience*, v. 30, n. 4, p. 275–282, jul. 2005.

BRAMLEY, P. M. *et al.* Vitamin E. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, v. 80, n. 7, p. 913–938, maio 2000.

BRIGELIUS-FLOHÉ, R.; TRABER, M. G. Vitamin E: function and metabolism. *The FASEB Journal*, v. 13, n. 10, p. 1145–1155, jul. 1999.

BROCARD, P. S. *et al.* Antidepressant-like effect of folic acid: Involvement of NMDA receptors and L-arginine-nitric oxide-cyclic guanosine monophosphate pathway. *European Journal of Pharmacology*, v. 598, n. 1-3, p. 37–42, nov. 2008.

BROCARD, P. S. *et al.* Folic acid administration produces an antidepressant-like effect in mice: evidence for the involvement of the serotonergic and noradrenergic systems. *Neuropharmacology*, v. 54, n. 2, p. 464–473, fev. 2008.

BRUNELLO, N. *et al.* The role of noradrenaline and selective noradrenaline reuptake inhibition in depression. *European Neuropsychopharmacology*, v. 12, n. 5, p. 461–475, out. 2002.

CALABRESE, V. *et al.* Nitric oxide in the central nervous system: neuroprotection versus neurotoxicity. *Nature reviews. Neuroscience*, v. 8, n. 10, p. 766–775, out. 2007.

CAPURON, L.; RAVAUD, A.; DANTZER, R. Early depressive symptoms in cancer patients receiving interleukin 2 and/or interferon alfa-2b therapy. *Journal of clinical oncology*, v. 18, n. 10, p. 2143–2151, maio 2000.

CAPURON, L. *et al.* Vitamin E status and quality of life in the elderly: influence of inflammatory processes. *The British Journal of Nutrition*, v. 102, n. 10, p. 1390–1394, nov. 2009.

CASSIDY-BUSHROW, A. E. *et al.* Association of depressive symptoms with inflammatory biomarkers among pregnant African-American women. *Journal of reproductive immunology*, mar. 2012.

CASTAÑÉ, A.; ARTIGAS, F.; BORTOLOZZI, A. The absence of 5-HT(1A) receptors has minor effects on dopamine but not serotonin release evoked by MK-801 in mice prefrontal cortex. *Psychopharmacology*, v. 200, n. 2, p. 281–290, out. 2008.



CASTAÑO, A. *et al.* Changes in the turnover of monoamines in prefrontal cortex of rats fed on vitamin E-deficient diet. *Journal of Neurochemistry*, v. 58, n. 5, p. 1889–1895, maio 1992.

CATENA-DELL'OSSO, M. *et al.* Inflammatory and neurodegenerative pathways in depression: a new avenue for antidepressant development? *Current Medicinal Chemistry*, v. 18, n. 2, p. 245–255, 2011.

CETIN, E. *et al.* Effect of vitamin E supplementation with exercise on cognitive functions and total antioxidant capacity in older people. *The Journal of Nutrition, Health & Aging*, v. 14, n. 9, p. 763–769, nov. 2010.

CHANG, J.; MUSSER, J.H.; MCGREGOR, H. Phospholipase A2: function and pharmacological regulation. *Biochemical Pharmacology*. v.36, p. 2429–36, ago. 1987.

CHANG, Y. *et al.* Inhibitory Effects of Ketamine on Lipopolysaccharide-Induced Microglial Activation. *Mediators of Inflammation*, v. 2009, p. 1–7, 2009.

CHARO, I. F.; RANSOHOFF, R. M. The many roles of chemokines and chemokine receptors in inflammation. *The New England journal of medicine*, v. 354, n. 6, p. 610–621, fev. 2006.

CHASE, T. N.; MURPHY, D. L. Serotonin and Central Nervous System Function. *Annual Review of Pharmacology*, v. 13, n. 1, p. 181–197, 1973.

CHEN, S.-J. *et al.* Antidepressant administration modulates neural stem cell survival and serotonergic differentiation through bcl-2. *Current neurovascular research*, v. 4, n. 1, p. 19–29, fev. 2007.

CHIOU, S.-H. *et al.* Fluoxetine up-regulates expression of cellular FLICE-inhibitory protein and inhibits LPS-induced apoptosis in hippocampus-derived neural stem cell. *Biochemical and biophysical research communications*, v. 343, n. 2, p. 391–400, maio 2006.

CHOPRA, K.; KUMAR, B.; KUHAD, A. Pathobiological targets of depression. *Expert Opinion on Therapeutic Targets*, v. 15, n. 4, p. 379–400, abr. 2011.

CHOURBAJI, S. *et al.* IL-6 knockout mice exhibit resistance to stress-induced development of depression-like behaviors. *Neurobiology of disease*, v. 23, n. 3, p. 587–594, set. 2006.

CHUNG, C. New perspectives on glutamate receptor antagonists as antidepressants. *Archives of pharmacal research*, v. 35, n. 4, p. 573–577, mar. 2012.

COCCARO, E. F. *et al.* Serotonin in mood and personality disorders. In: COCCARO, E. F.; MURPHY, D. L. (Org.). *Serotonin in major psychiatric disorders*. Progress in psychiatry, No. 21. Washington, DC, US: American Psychiatric Association, 1990. p. 71–97.

COHEN, P. The hormonal control of glycogen metabolism in mammalian muscle by multivalent phosphorylation. *Biochemical Society transactions*, v. 7, n. 3, p. 459–480, jun. 1979.

COLE, J. *et al.* Subregional hippocampal deformations in major depressive disorder. *Journal of affective disorders*, v. 126, n. 1-2, p. 272–277, out. 2010.

COMIN, D. *et al.* Vitamin E improves learning performance and changes the expression of nitric oxide-producing neurons in the brains of diabetic rats. *Behavioural Brain Research*, v. 210, n. 1, p. 38–45, 26 jun. 2010.

CORDOVA, F. M. *et al.* Lead stimulates ERK1/2 and p38MAPK phosphorylation in the hippocampus of immature rats. *Brain research*, v. 998, n. 1, p. 65–72, fev. 2004.

CORTÉS-VIEYRA, R. *et al.* Role of glycogen synthase kinase-3 beta in the inflammatory response caused by bacterial pathogens. *Journal of inflammation*, v. 9, n. 1, p. 23, jun. 2012.

COSTA, C.; INCIO, J.; SOARES, R. Angiogenesis and chronic inflammation: cause or consequence?. *Angiogenesis*, v. 10, n. 3, p. 149–166, 2007.

CRYAN, J. F.; LEONARD, B. E. 5-HT<sub>1A</sub> and beyond: the role of serotonin and its receptors in depression and the antidepressant

response. *Human psychopharmacology*, v. 15, n. 2, p. 113–135, mar. 2000.

CRYAN, J. F.; MARKOU, A.; LUCKI, I. Assessing antidepressant activity in rodents: recent developments and future needs. *Trends in pharmacological sciences*, v. 23, n. 5, p. 238–245, maio 2002.

CRYAN, J. F.; MOMBÉREAU, C.; VASSOUT, A. The tail suspension test as a model for assessing antidepressant activity: review of pharmacological and genetic studies in mice. *Neuroscience and biobehavioral reviews*, v. 29, n. 4-5, p. 571–625, 2005.

CRYAN, J. F.; SLATTERY, D. A. Animal models of mood disorders: Recent developments. *Current opinion in psychiatry*, v. 20, n. 1, p. 1–7, jan. 2007.

CUNHA, M.P. *et al.* Interaction of zinc with antidepressants in the tail suspension test. *Progress in Neuro-psychopharmacology & Biological Psychiatry*, v. 32, p. 1913–20, 2008.

DAILY, E. *et al.* Dopamine, depression and antidepressants. *Fundamental & clinical pharmacology*, v. 18, n. 6, p. 601–607, dez. 2004.

DANTZER, R. *et al.* From inflammation to sickness and depression: when the immune system subjugates the brain. *Nature Reviews. Neuroscience*, v. 9, n. 1, p. 46–56, jan. 2008.

DAUBERT, E. A.; CONDRON, B. G. Serotonin: a regulator of neuronal morphology and circuitry. *Trends in neurosciences*, v. 33, n. 9, p. 424–434, set. 2010.

DEAK, T. *et al.* Behavioral responses during the forced swim test are not affected by anti-inflammatory agents or acute illness induced by lipopolysaccharide. *Behavioural Brain Research*, v. 160, n. 1, p. 125–134, maio 2005.

DELLAGIOIA, N. *et al.* Bupropion pre-treatment of endotoxin-induced depressive symptoms. *Brain, behavior, and immunity*, out. 2012.

DESRUMAUX, C. *et al.* Phospholipid transfer protein (PLTP) deficiency reduces brain vitamin E content and increases anxiety in mice. *The FASEB Journal*, v. 19, n. 2, p. 296–297, fev. 2005.

DEVARAJ, S.; JIALAL, I. Alpha-tocopherol decreases interleukin-1 beta release from activated human monocytes by inhibition of 5-lipoxygenase. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*, v. 19, n. 4, p. 1125–1133, abr. 1999.

DEVARAJ, S.; JIALAL, I. Alpha tocopherol supplementation decreases serum C-reactive protein and monocyte interleukin-6 levels in normal volunteers and type 2 diabetic patients. *Free radical biology & medicine*, v. 29, n. 8, p. 790–792, out. 2000.

DHABHAR, F. S. *et al.* Low serum IL-10 concentrations and loss of regulatory association between IL-6 and IL-10 in adults with major depression. *Journal of Psychiatric Research*, v. 43, n. 11, p. 962–969, jul. 2009.

DHIR, A.; KULKARNI, S. K. Involvement of nitric oxide (NO) signaling pathway in the antidepressant action of bupropion, a dopamine reuptake inhibitor. *European journal of pharmacology*, v. 568, n. 1-3, p. 177–185, jul. 2007.

DHIR, A.; KULKARNI, S. K. Possible involvement of nitric oxide (NO) signaling pathway in the antidepressant-like effect of MK-801(dizocilpine), a NMDA receptor antagonist in mouse forced swim test. *Indian journal of experimental biology*, v. 46, n. 3, p. 164–170, mar. 2008.

DHIR, A.; KULKARNI, S. K. Nitric oxide and major depression. *Nitric oxide: biology and chemistry*, v. 24, n. 3, p. 125–131, abr. 2011.

DIAZGRANADOS, N. *et al.* Rapid resolution of suicidal ideation after a single infusion of an N-methyl-D-aspartate antagonist in patients with treatment-resistant major depressive disorder. *The Journal of clinical psychiatry*, v. 71, n. 12, p. 1605–1611, dez. 2010.

DINAN, T. G. Inflammatory markers in depression. *Current Opinion in Psychiatry*, v. 22, n. 1, p. 32–36, jan. 2009.

DINIZ, D. B. *et al.* Comparing the impact of chronic energy restriction and vitamin E supplementation on the behavior of adult rats. *Archivos Latinoamericanos De Nutrición*, v. 59, n. 3, p. 287–295, set. 2009.

DOWLATI, Y. *et al.* A Meta-Analysis of Cytokines in Major Depression. *Biological Psychiatry*, v. 67, n. 5, p. 446–457, mar. 2010.

DREVETS, W. C. *et al.* A functional anatomical study of unipolar depression. *The Journal of Neuroscience*, v. 12, n. 9, p. 3628–3641, jan. 1992.

DUMAN, R. S. Depression: a case of neuronal life and death? *Biological Psychiatry*, v. 56, n. 3, p. 140–145, ago. 2004.

DUMAN, R. S.; HENINGER, G. R.; NESTLER, E. J. A molecular and cellular theory of depression. *Archives of General Psychiatry*, v. 54, n. 7, p. 597–606, jul. 1997.

DUMAN, R. S.; MONTEGGIA, L. M. A neurotrophic model for stress-related mood disorders. *Biological Psychiatry*, v. 59, n. 12, p. 1116–1127, jun. 2006.

DUMAN, R. S.; VOLETI, B. Signaling pathways underlying the pathophysiology and treatment of depression: novel mechanisms for rapid-acting agents. *Trends in Neurosciences*, v. 35, n. 1, p. 47–56, jan. 2012.

DUNN, A. J.; SWIERGIEL, A. H. Effects of interleukin-1 and endotoxin in the forced swim and tail suspension tests in mice. *Pharmacology, biochemistry, and behavior*, v. 81, n. 3, p. 688–693, jul. 2005.

DUNN, J. E. *et al.* Serum alpha-tocopherol, concurrent and past vitamin E intake, and mild cognitive impairment. *Neurology*, v. 68, n. 9, p. 670–676, fev. 2007.

EBMEIER, K. P.; DONAGHEY, C.; STEELE, J. D. Recent developments and current controversies in depression. *Lancet*, v. 367, n. 9505, p. 153–167, jan. 2006.

EINVIK, G. *et al.* Circulating cytokine concentrations are not associated with major depressive disorder in a community-based cohort. *General hospital psychiatry*, v. 34, n. 3, p. 262–267, maio 2012.

EL MANSARI, M. *et al.* Relevance of Norepinephrine–Dopamine Interactions in the Treatment of Major Depressive Disorder. *CNS Neuroscience & Therapeutics*, v. 16, n. 3, p. e1–e17, jun. 2010.

ELHWUEGI, A. S. Central monoamines and their role in major depression. *Progress in neuro-psychopharmacology & biological psychiatry*, v. 28, n. 3, p. 435–451, maio 2004.

ESPLUGUES, J. V. NO as a signalling molecule in the nervous system. *British Journal of Pharmacology*, v. 135, n. 5, p. 1079–1095, mar. 2002.

ETMINAN, M.; GILL, S. S.; SAMII, A. Intake of vitamin E, vitamin C, and carotenoids and the risk of Parkinson's disease: a meta-analysis. *Lancet neurology*, v. 4, n. 6, p. 362–365, jun. 2005.

EVANS, D. L. *et al.* Mood Disorders in the Medically Ill: Scientific Review and Recommendations. *Biological Psychiatry*, v. 58, n. 3, p. 175–189, ago. 2005.

EVANS, H. M.; BISHOP, K. S. On the Existence of a Hitherto Unrecognized Dietary Factor Essential for Reproduction. *Science*, v. 56, n. 1458, p. 650–651, ago. 1922.

FÉRNANDEZ-CALLE, P. *et al.* Serum levels of alpha-tocopherol (vitamin E) in Parkinson's disease. *Neurology*, v. 42, n. 5, p. 1064–1066, maio 1992.

FERREIRA, F. R. *et al.* Antidepressant-like effects of N-acetyl-L-cysteine in rats. *Behavioural Pharmacology*, v. 19, n. 7, p. 747–750, out. 2008.

FERTUZINHOS, S. M. M. *et al.* Analysis of IL-1alpha, IL-1beta, and IL-1RA [correction of IL-RA] polymorphisms in dysthymia. *Journal of molecular neuroscience*, v. 22, n. 3, p. 251–256, 2004.

FIORE, M. *et al.* Neurobehavioral alterations in developing transgenic mice expressing TNF-alpha in the brain. *Brain, behavior, and immunity*, v. 10, n. 2, p. 126–138, jun. 1996.

FRANGOU, S. Functional neuroimaging in mood disorders. *Psychiatry*, v. 5, n. 5, p. 176–179, maio 2009.

FRYE, M. A. *et al.* Low cerebrospinal fluid glutamate and glycine in refractory affective disorder. *Biological psychiatry*, v. 61, n. 2, p. 162–166, jan. 2007.

FUCHS, E. *et al.* Alterations of neuroplasticity in depression: the hippocampus and beyond. *European Neuropsychopharmacology*, v. 14, Supplement 5, p. S481–S490, dez. 2004.

GAŁECKI, P. *et al.* The expression of genes encoding for COX-2, MPO, iNOS, and sPLA2-IIA in patients with recurrent depressive disorder. *Journal of affective disorders*, v. 138, n. 3, p. 360–366, maio 2012.

GALLO-TORRES, H. Obligatory role of bile for the intestinal absorption of vitamin E. *Lipids*, v. 5, n. 4, p. 379–384, 1970.

GARCIA, L. S. B. *et al.* Acute administration of ketamine induces antidepressant-like effects in the forced swimming test and increases BDNF levels in the rat hippocampus. *Progress in neuro-psychopharmacology & biological psychiatry*, v. 32, n. 1, p. 140–144, jan. 2008.

GAVARD, J. A.; LUSTMAN, P. J.; CLOUSE, R. E. Prevalence of Depression in Adults With Diabetes: An Epidemiological Evaluation. *Diabetes Care*, v. 16, n. 8, p. 1167–1178, jan. 1993.

GERACIOTI, T. D., Jr *et al.* Uncoupling of serotonergic and noradrenergic systems in depression: preliminary evidence from continuous cerebrospinal fluid sampling. *Depression and anxiety*, v. 6, n. 3, p. 89–94, 1997.

GERMAN, L. *et al.* Depressive symptoms are associated with food insufficiency and nutritional deficiencies in poor community-dwelling

elderly people. *The Journal of Nutrition, Health & Aging*, v. 15, n. 1, p. 3–8, 2011.

GHASEMI, M. *et al.* NMDA receptor/nitergic system blockage augments antidepressant-like effects of paroxetine in the mouse forced swimming test. *Psychopharmacology*, v. 206, n. 2, p. 325–333, out. 2009.

GHASEMI, M.; RAZA, M.; DEHPOUR, A. R. NMDA receptor antagonists augment antidepressant-like effects of lithium in the mouse forced swimming test. *Journal of Psychopharmacology*, v. 24, n. 4, p. 585–594, jan. 2010.

GODBOUT, J. P. *et al.* Alpha-tocopherol reduces lipopolysaccharide-induced peroxide radical formation and interleukin-6 secretion in primary murine microglia and in brain. *Journal of Neuroimmunology*, v. 149, n. 1-2, p. 101–109, abr. 2004.

GODBOUT, J. P. *et al.* Alpha-tocopherol attenuates NFkappaB activation and pro-inflammatory cytokine production in brain and improves recovery from lipopolysaccharide-induced sickness behavior. *Journal of Neuroimmunology*, v. 169, n. 1-2, p. 97–105, dez. 2005.

GOHIL, K. *et al.* Mice lacking alpha-tocopherol transfer protein gene have severe alpha-tocopherol deficiency in multiple regions of the central nervous system. *Brain Research*, v. 1201, p. 167–176, 27 mar. 2008.

GÓMEZ-SINTES, R. *et al.* GSK-3 Mouse Models to Study Neuronal Apoptosis and Neurodegeneration. *Frontiers in Molecular Neuroscience*, v. 4, nov. 2011.

GORMAN, J. M.; SULLIVAN, G. Noradrenergic approaches to antidepressant therapy. *The Journal of clinical psychiatry*, v. 61 Suppl 1, p. 13–16, 2000.

GOTI, D. *et al.* Uptake of lipoprotein-associated alpha-tocopherol by primary porcine brain capillary endothelial cells. *Journal of Neurochemistry*, v. 74, n. 4, p. 1374–1383, abr. 2000.



GOTODA, T. *et al.* Adult-onset spinocerebellar dysfunction caused by a mutation in the gene for the alpha-tocopherol-transfer protein. *The New England journal of medicine*, v. 333, n. 20, p. 1313–1318, nov. 1995.

GOULD, T. D. *et al.* AR-A014418, a selective GSK-3 inhibitor, produces antidepressant-like effects in the forced swim test. *The international journal of neuropsychopharmacology*, v. 7, n. 4, p. 387–390, dez. 2004.

GRAHAM, J. R.; TULLAI, J. W.; COOPER, G. M. GSK-3 represses growth factor-inducible genes by inhibiting NF-kappaB in quiescent cells. *The Journal of biological chemistry*, v. 285, n. 7, p. 4472–4480, fev. 2010.

GRIMES, C. A.; JOPE, R. S. The multifaceted roles of glycogen synthase kinase 3beta in cellular signaling. *Progress in neurobiology*, v. 65, n. 4, p. 391–426, nov. 2001.

GU, J.-H. *et al.* Inhibition of NF-κB activation is associated with anti-inflammatory and anti-apoptotic effects of Ginkgolide B in a mouse model of cerebral ischemia/reperfusion injury. *European journal of pharmaceutical sciences*, jul. 2012.

GU, Z. *et al.* S-Nitrosylation of Matrix Metalloproteinases: Signaling Pathway to Neuronal Cell Death. *Science*, v. 297, n. 5584, p. 1186–1190, ago. 2002.

HABER, S. N.; KNUTSON, B. The reward circuit: linking primate anatomy and human imaging. *Neuropsychopharmacology*, v. 35, n. 1, p. 4–26, jan. 2010.

HABIB, S.; ALI, A. Biochemistry of nitric oxide. *Indian journal of clinical biochemistry*, v. 26, n. 1, p. 3–17, jan. 2011.

HARA, M. R.; SNYDER, S. H. Cell signaling and neuronal death. *Annual review of pharmacology and toxicology*, v. 47, p. 117–141, 2007.

HARKIN, A. J. *et al.* Nitric oxide synthase inhibitors have antidepressant-like properties in mice. 1. Acute treatments are active in

the forced swim test. *European journal of pharmacology*, v. 372, n. 3, p. 207–213, maio 1999.

HASHIMOTO, K.; SAWA, A.; IYO, M. Increased levels of glutamate in brains from patients with mood disorders. *Biological psychiatry*, v. 62, n. 11, p. 1310–1316, dez. 2007.

HAYLEY, S. *et al.* The pathogenesis of clinical depression: stressor- and cytokine-induced alterations of neuroplasticity. *Neuroscience*, v. 135, n. 3, p. 659–678, 2005.

HELLER, R.; WERNER-FELMAYER, G.; WERNER, E. R. Alpha-Tocopherol and endothelial nitric oxide synthesis. *Annals of the New York Academy of Sciences*, v. 1031, p. 74–85, dez. 2004.

HENGARTNER, M. O. The biochemistry of apoptosis. *Nature*, v. 407, n. 6805, p. 770–776, out. 2000.

HERRERA, E.; BARBAS, C. Vitamin E: action, metabolism and perspectives. *Journal of Physiology and Biochemistry*, v. 57, n. 2, p. 43–56, mar. 2001.

HESLOP, K. E. *et al.* Serotonin metabolism and release in frontal cortex of rats on a vitamin E-deficient diet. *Journal of Neurochemistry*, v. 66, n. 2, p. 860–864, fev. 1996.

HOLTZHEIMER, P. E.; NEMEROFF, C. B. Advances in the treatment of depression. *NeuroRx: The Journal of the American Society for Experimental NeuroTherapeutics*, v. 3, n. 1, p. 42–56, jan. 2006.

HOWREN, M. B.; LAMKIN, D. M.; SULS, J. Associations of depression with C-reactive protein, IL-1, and IL-6: a meta-analysis. *Psychosomatic Medicine*, v. 71, n. 2, p. 171–186, fev. 2009.

HUANG, Y.-Y. *et al.* Desipramine Activated Bcl-2 Expression and Inhibited Lipopolysaccharide-Induced Apoptosis in Hippocampus-Derived Adult Neural Stem Cells. *Journal of Pharmacological Sciences*, v. 104, n. 1, p. 61–72, 2007.

HUGHES, M. M. *et al.* Tryptophan depletion in depressed patients occurs independent of kynurenine pathway activation. *Brain, behavior, and immunity*, v. 26, n. 6, p. 979–987, ago. 2012.

HUGHES, R. N.; LOWTHER, C. L.; VAN NOBELEN, M. Prolonged treatment with vitamins C and E separately and together decreases anxiety-related open-field behavior and acoustic startle in hooded rats. *Pharmacology, Biochemistry, and Behavior*, v. 97, n. 3, p. 494–499, jan. 2011.

HURLEY, L. L.; TIZABI, Y. Neuroinflammation, Neurodegeneration, and Depression. *Neurotoxicity research*, ago. 2012.

IRIE, M.; MIYATA, M.; KASAI, H. Depression and possible cancer risk due to oxidative DNA damage. *Journal of Psychiatric Research*, v. 39, n. 6, p. 553–560, nov. 2005.

IZQUIERDO, I. *et al.* The molecular cascades of long-term potentiation underlie memory consolidation of one-trial avoidance in the CA1 region of the dorsal hippocampus, but not in the basolateral amygdala or the neocortex. *Neurotoxicity Research*, v. 14, n. 2-3, p. 273-294, 2008.

JAGTAP, P.; SZABÓ, C. Poly(ADP-ribose) polymerase and the therapeutic effects of its inhibitors. *Nature reviews. Drug discovery*, v. 4, n. 5, p. 421–440, maio 2005.

JOCA, S. R. L.; GUIMARÃES, F. S. Inhibition of neuronal nitric oxide synthase in the rat hippocampus induces antidepressant-like effects. *Psychopharmacology*, v. 185, n. 3, p. 298–305, abr. 2006.

JONAS, B. S.; FRANKS, P.; INGRAM, D. D. Are symptoms of anxiety and depression risk factors for hypertension? Longitudinal evidence from the National Health and Nutrition Examination Survey I Epidemiologic Follow-up Study. *Archives of family medicine*, v. 6, n. 1, p. 43–49, fev. 1997.

JOPE, R. S.; JOHNSON, G. V. W. The glamour and gloom of glycogen synthase kinase-3. *Trends in biochemical sciences*, v. 29, n. 2, p. 95–102, fev. 2004.

JU, J. *et al.* A  $\gamma$ -Tocopherol-Rich Mixture of Tocopherols Inhibits Colon Inflammation and Carcinogenesis in Azoxymethane and Dextran Sulfate Sodium-Treated Mice. *Cancer prevention research*, v. 2, n. 2, p. 143–152, fev. 2009.

JUN, T.-Y. *et al.* Possible association between -G308A tumour necrosis factor-alpha gene polymorphism and major depressive disorder in the Korean population. *Psychiatric genetics*, v. 13, n. 3, p. 179–181, set. 2003.

JUURLINK, B.H.; PATERSON, P.G. Review of oxidative stress in brain and spinal cord injury: suggestions for pharmacological and nutritional management strategies. *Journal of Spinal Cord Medicine*, v.21, p. 309-34, out. 1998.

KANG, J. H. *et al.* A randomized trial of vitamin E supplementation and cognitive function in women. *Archives of Internal Medicine*, v. 166, n. 22, p. 2462–2468, dez. 2006.

KAREGE, F. *et al.* Alteration in kinase activity but not in protein levels of protein kinase B and glycogen synthase kinase-3beta in ventral prefrontal cortex of depressed suicide victims. *Biological psychiatry*, v. 61, n. 2, p. 240–245, jan. 2007.

KASTER, M. P. *et al.* Depressive-like behavior induced by tumor necrosis factor- $\alpha$  in mice. *Neuropharmacology*, v. 62, n. 1, p. 419–426, jan. 2012.

KATON, W. J. Clinical and health services relationships between major depression, depressive symptoms, and general medical illness. *Biological Psychiatry*, v. 54, n. 3, p. 216–226, ago. 2003.

KEMPNÁ, P. *et al.* Inhibition of HMC-1 Mast Cell Proliferation by Vitamin E - Involvement of the Protein Kinase B Pathway. *Journal of Biological Chemistry*, v. 279, n. 49, p. 50700–50709, mar. 2004.

KENIS, G.; MAES, M. Effects of antidepressants on the production of cytokines. *The International Journal of Neuropsychopharmacology*, v. 5, n. 4, p. 401–412, dez. 2002.

KESSLER, R. C. *et al.* Lifetime prevalence and age-of-onset distributions of DSM-IV disorders in the National Comorbidity Survey Replication. *Archives of General Psychiatry*, v. 62, n. 6, p. 593–602, jun. 2005.

KHAIROVA, R. A. *et al.* A potential role for pro-inflammatory cytokines in regulating synaptic plasticity in major depressive disorder. *The international journal of neuropsychopharmacology*, v. 12, n. 4, p. 561–578, maio 2009.

KHANNA, S. *et al.* Nanomolar vitamin E  $\alpha$ -tocotrienol inhibits glutamate-induced activation of phospholipase A2 and causes neuroprotection. *Journal of neurochemistry*, v. 112, n. 5, p. 1249–1260, mar. 2010.

KIM, Y.-K. *et al.* Increased plasma nitric oxide level associated with suicide attempt in depressive patients. *Progress in neuro-psychopharmacology & biological psychiatry*, v. 30, n. 6, p. 1091–1096, ago. 2006.

KING, D.; PLAYFER, J. R.; ROBERTS, N. B. Concentrations of vitamins A, C and E in elderly patients with Parkinson's disease. *Postgraduate medical journal*, v. 68, n. 802, p. 634–637, ago. 1992.

KOBAYASHI, M. S.; HAN, D.; PACKER, L. Antioxidants and herbal extracts protect HT-4 neuronal cells against glutamate-induced cytotoxicity. *Free Radical Research*, v. 32, n. 2, p. 115–124, jan. 2000.

KORNHUBER, J.; WELLER, M. Psychotogenicity and N-methyl-D-aspartate receptor antagonism: implications for neuroprotective pharmacotherapy. *Biological psychiatry*, v. 41, n. 2, p. 135–144, jan. 1997.

KRASS, M. *et al.* The antidepressant action of imipramine and venlafaxine involves suppression of nitric oxide synthesis. *Behavioural brain research*, v. 218, n. 1, p. 57–63, mar. 2011.

KREISS, D. S.; LUCKI, I. Effects of acute and repeated administration of antidepressant drugs on extracellular levels of 5-hydroxytryptamine measured in vivo. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics*, v. 274, n. 2, p. 866–876, ago. 1995.

KRISHNADAS, R.; CAVANAGH, J. Depression: an inflammatory illness? *Journal of neurology, neurosurgery, and psychiatry*, v. 83, n. 5, p. 495–502, maio 2012.

KRISHNAN, R. *et al.* Effects of etanercept therapy on fatigue and symptoms of depression in subjects treated for moderate to severe plaque psoriasis for up to 96 weeks. *British Journal of Dermatology*, v. 157, n. 6, p. 1275–1277, 2007.

KRONFOL, Z.; REMICK, D. G. Cytokines and the Brain: Implications for Clinical Psychiatry. *American Journal of Psychiatry*, v. 157, n. 5, p. 683–694, maio 2000.

KRÜGEL, U. *et al.* Antidepressant effects of TNF- $\alpha$  blockade in an animal model of depression. *Journal of Psychiatric Research*, 2013.

KUBERA M. *et al.* Effect of mild chronic stress, as a model of depression, on the immunoreactivity of C57BL/6 mice. *International Journal of Immunopharmacology*, v. 20, p. 781–789, dez. 1998.

KUBERA, M. *et al.* Prolonged desipramine treatment increases the production of interleukin-10, an anti-inflammatory cytokine, in C57BL/6 mice subjected to the chronic mild stress model of depression. *Journal of affective disorders*, v. 63, n. 1–3, p. 171–178, mar. 2001.

KUBERA, M. *et al.* In animal models, psychosocial stress-induced (neuro)inflammation, apoptosis and reduced neurogenesis are associated to the onset of depression. *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry*, v. 35, n. 3, p. 744–759, abr. 2011.

KUKNER, A. *et al.* Effect of the Vitamin E on Expression of Apoptosis-Related Proteins in Immobilized Rat Testes. *Journal of Animal and Veterinary Advances*, v. 9, n. 1, p. 180–185, jan. 2010.

KULKARNI, S. K.; BHUTANI, M. K.; BISHNOI, M. Antidepressant activity of curcumin: involvement of serotonin and dopamine system. *Psychopharmacology*, v. 201, n. 3, p. 435–442, dez. 2008.

LANQUILLON, S. *et al.* Cytokine production and treatment response in major depressive disorder. *Neuropsychopharmacology*, v. 22, n. 4, p. 370–379, abr. 2000.

LEAL, R. B. *et al.* Lead-stimulated p38 MAPK-dependent Hsp27 phosphorylation. *Toxicology and Applied Pharmacology*, v. 178, n. 1, p. 44–51, jan. 2002.

LEDO, J.H. *et al.* Amyloid- $\beta$  oligomers link depressive-like behavior and cognitive deficits in mice. *Molecular Psychiatry*. p. 1-2, 2012.

LEE, A. L.; OGLE, W. O.; SAPOLSKY, R. M. Stress and depression: possible links to neuron death in the hippocampus. *Bipolar Disorders*, v. 4, n. 2, p. 117–128, 2002.

LEE, B.-H. *et al.* Increased Plasma Nitric Oxide Metabolites in Suicide Attempters. *Neuropsychobiology*, v. 53, n. 3, p. 127–132, 2006.

LEMAIRE-EWING, S. *et al.* Vitamin E transport, membrane incorporation and cell metabolism: Is alpha-tocopherol in lipid rafts an oar in the lifeboat? *Molecular Nutrition & Food Research*, v. 54, n. 5, p. 631–640, maio 2010.

LEONARD, B.; MAES, M. Mechanistic explanations how cell-mediated immune activation, inflammation and oxidative and nitrosative stress pathways and their sequels and concomitants play a role in the pathophysiology of unipolar depression. *Neuroscience and biobehavioral reviews*, v. 36, n. 2, p. 764–785, fev. 2012.

LÉPINE, J.-P.; BRILEY, M. The increasing burden of depression. *Neuropsychiatric Disease and Treatment*, v. 7, n. Suppl 1, p. 3–7, 2011.

LEVINE, J. *et al.* Increased cerebrospinal fluid glutamine levels in depressed patients. *Biological psychiatry*, v. 47, n. 7, p. 586–593, abr. 2000.

LI, D. *et al.* Different Isoforms of Tocopherols Enhance Nitric Oxide Synthase Phosphorylation and Inhibit Human Platelet Aggregation and Lipid Peroxidation: Implications in Therapy with Vitamin E. *Journal of Cardiovascular Pharmacology and Therapeutics*, v. 6, n. 2, p. 155–161, jan. 2001.

LI, N. *et al.* Glutamate N-methyl-D-aspartate receptor antagonists rapidly reverse behavioral and synaptic deficits caused by chronic stress exposure. *Biological psychiatry*, v. 69, n. 8, p. 754–761, abr. 2011.

LI, X. *et al.* In vivo regulation of glycogen synthase kinase-3 $\beta$  (GSK3 $\beta$ ) by serotonergic activity in mouse brain. *Neuropsychopharmacology*, v. 29, n. 8, p. 1426–1431, ago. 2004.

LINSEMAN, D. A. *et al.* Glycogen synthase kinase-3 $\beta$  phosphorylates Bax and promotes its mitochondrial localization during neuronal apoptosis. *The Journal of neuroscience*, v. 24, n. 44, p. 9993–10002, nov. 2004.

LIU, B. *et al.* Role of Nitric Oxide in Inflammation-Mediated Neurodegeneration. *Annals of the New York Academy of Sciences*, v. 962, p. 318–331, maio 2002.

LIU, B.; HONG, J.-S. Role of Microglia in Inflammation-Mediated Neurodegenerative Diseases: Mechanisms and Strategies for Therapeutic Intervention. *The Journal Of Pharmacology And Experimental Therapeutics*, v. 304, n.1, p. 1-7, 2003.

LOBATO, K.R. Avaliação do efeito antidepressivo da vitamina E em modelos animais de depressão. Dissertação apresentada ao Programa de Pós Graduação em Neurociências. Universidade Federal de Santa Catarina. 2009.

LOBATO, K. R. *et al.* alpha-Tocopherol administration produces an antidepressant-like effect in predictive animal models of depression. *Behavioural Brain Research*, v. 209, n. 2, p. 249–259, jun. 2010.

LOIX, S.; DE KOCK, M.; HENIN, P. The anti-inflammatory effects of ketamine: state of the art. *Acta anaesthesiologica Belgica*, v. 62, n. 1, p. 47–58, 2011.

LÖSCHER, W.; ANNIES, R.; HÖNACK, D. The N-methyl-D-aspartate receptor antagonist MK-801 induces increases in dopamine and serotonin metabolism in several brain regions of rats. *Neuroscience letters*, v. 128, n. 2, p. 191–194, jul. 1991.

MACQUEEN, G. M. *et al.* Course of illness, hippocampal function, and hippocampal volume in major depression. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, v. 100, n. 3, p. 1387–1392, abr. 2003.



MAES, M. *et al.* Negative immunoregulatory effects of antidepressants: inhibition of interferon-gamma and stimulation of interleukin-10 secretion. *Neuropsychopharmacology*, v. 20, n. 4, p. 370–379, abr. 1999.

MAES, M. *et al.* Lower serum vitamin E concentrations in major depression. Another marker of lowered antioxidant defenses in that illness. *Journal of Affective Disorders*, v. 58, n. 3, p. 241–246, jun. 2000.

MAES, M. The cytokine hypothesis of depression: inflammation, oxidative & nitrosative stress (IO&NS) and leaky gut as new targets for adjunctive treatments in depression. *Neuro Endocrinology Letters*, v. 29, n. 3, p. 287–291, jun. 2008.

MAES, M. *et al.* The inflammatory & neurodegenerative (I&ND) hypothesis of depression: leads for future research and new drug developments in depression. *Metabolic Brain Disease*, v. 24, n. 1, p. 27–53, mar. 2009.

MAES, M. *et al.* A review on the oxidative and nitrosative stress (O&NS) pathways in major depression and their possible contribution to the (neuro)degenerative processes in that illness. *Progress in Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry*, v. 35, n. 3, p. 676–692, abr. 2011.

MAES, M. *et al.* New drug targets in depression: inflammatory, cell-mediated immune, oxidative and nitrosative stress, mitochondrial, antioxidant, and neuroprogressive pathways. And new drug candidates- Nrf2 activators and GSK-3 inhibitors. *Inflammopharmacology*, jan. 2012.

MAGALHÃES, J. *et al.* Vitamin E prevents hypobaric hypoxia-induced mitochondrial dysfunction in skeletal muscle. *Clinical science*, v. 113, n. 12, p. 459–466, dez. 2007.

MAKINO, M. *et al.* Enhancement of immobility in mouse forced swimming test by treatment with human interferon. *European Journal of Pharmacology*, v. 356, n. 1, p. 1–7, ago. 1998.

MALBERG, J. E. *et al.* Chronic Antidepressant Treatment Increases Neurogenesis in Adult Rat Hippocampus. *The Journal of Neuroscience*, v. 20, n. 24, p. 9104–9110, dez. 2000.

MALBERG, J. E. Implications of adult hippocampal neurogenesis in antidepressant action. *Journal of Psychiatry and Neuroscience*, v. 29, n. 3, p. 196, maio 2004.

MALYKHIN, N. V. *et al.* Structural changes in the hippocampus in major depressive disorder: contributions of disease and treatment. *Journal of Psychiatry & Neuroscience*, v. 35, n. 5, p. 337–343, set. 2010.

MANGIALASCHE, F. *et al.* High plasma levels of vitamin E forms and reduced Alzheimer's disease risk in advanced age. *Journal of Alzheimer's Disease*, v. 20, n. 4, p. 1029–1037, 2010.

MANJI, H. K.; DREVETS, W. C.; CHARNEY, D. S. The cellular neurobiology of depression. *Nat Med*, v. 7, n. 5, p. 541–547, maio 2001.

MARSH, S. A. *et al.* Bcl-2 in endothelial cells is increased by vitamin E and alpha-lipoic acid supplementation but not exercise training. *Journal of molecular and cellular cardiology*, v. 38, n. 3, p. 445–451, mar. 2005.

MARTIN, M. *et al.* Toll-like receptor-mediated cytokine production is differentially regulated by glycogen synthase kinase 3. *Nature immunology*, v. 6, n. 8, p. 777–784, ago. 2005.

MATHEW, S. J.; KEEGAN, K.; SMITH, L. Glutamate modulators as novel interventions for mood disorders. *Revista brasileira de psiquiatria*, v. 27, n. 3, p. 243–248, set. 2005.

MATTSON, M. P. Apoptosis in neurodegenerative disorders. *Nature reviews. Molecular cell biology*, v. 1, n. 2, p. 120–129, nov. 2000.

MCARTHUR, R.; BORSINI, F. Animal models of depression in drug discovery: a historical perspective. *Pharmacology, biochemistry, and behavior*, v. 84, n. 3, p. 436–452, jul. 2006.

MCGEER, P. L.; MCGEER, E. G. Inflammation and the Degenerative Diseases of Aging. *Annals of the New York Academy of Sciences*, v. 1035, n. 1, p. 104–116, 2004.

MCNALLY, L.; BHAGWAGAR, Z.; HANNESTAD, J. Inflammation, glutamate, and glia in depression: a literature review. *CNS Spectrums*, v. 13, n. 6, p. 501–510, jun. 2008.

- MESSAOUDI, M. *et al.* Antidepressant-like effects of a cocoa polyphenolic extract in Wistar-Unilever rats. *Nutritional neuroscience*, v. 11, n. 6, p. 269–276, dez. 2008.
- MILLAN, M. J. The role of monoamines in the actions of established and “novel” antidepressant agents: a critical review. *European Journal of Pharmacology*, v. 500, n. 1–3, p. 371–384, out. 2004.
- MILLAN, M. J.; LEJEUNE, F.; GOBERT, A. Reciprocal autoreceptor and heteroreceptor control of serotonergic, dopaminergic and noradrenergic transmission in the frontal cortex: relevance to the actions of antidepressant agents. *Journal of Psychopharmacology*, v. 14, n. 2, p. 114–138, jan. 2000.
- MILLER, A. H.; MALETIC, V.; RAISON, C. L. Inflammation and its discontents: the role of cytokines in the pathophysiology of major depression. *Biological Psychiatry*, v. 65, n. 9, p. 732–741, maio 2009.
- MILLER, H. L. *et al.* Clinical and biochemical effects of catecholamine depletion on antidepressant-induced remission of depression. *Archives of general psychiatry*, v. 53, n. 2, p. 117–128, fev. 1996.
- MITANI, H. *et al.* Correlation between plasma levels of glutamate, alanine and serine with severity of depression. *Progress in neuro-psychopharmacology & biological psychiatry*, v. 30, n. 6, p. 1155–1158, ago. 2006.
- MOLINA, J. A. *et al.* Cerebrospinal fluid levels of alpha-tocopherol (vitamin E) in Parkinson’s disease. *Journal of neural transmission*, v. 104, n. 11–12, p. 1287–1293, 1997.
- MONCADA, S.; ERUSALIMSKY, J. D. Does nitric oxide modulate mitochondrial energy generation and apoptosis? *Nature reviews. Molecular cell biology*, v. 3, n. 3, p. 214–220, mar. 2002.
- MORETTI, M. *et al.* Involvement of nitric oxide-cGMP pathway in the antidepressant-like effect of ascorbic acid in the tail suspension test. *Behavioural Brain Research*, jul. 2011.

MORETTI, M. *et al.* Protective Effects of Ascorbic Acid on Behavior and Oxidative Status of Restraint-Stressed Mice. *Journal of molecular neuroscience*, out. 2012a.

MORETTI, M. *et al.* Ascorbic acid treatment, similarly to fluoxetine, reverses depressive-like behavior and brain oxidative damage induced by chronic unpredictable stress. *Journal of Psychiatric Research*, v.46, p. 331-341, 2012b.

MORI-OKAMOTO, J. *et al.* Pomegranate extract improves a depressive state and bone properties in menopausal syndrome model ovariectomized mice. *Journal of ethnopharmacology*, v. 92, n. 1, p. 93–101, maio 2004.

MULLER, D. P. R. Vitamin E and neurological function. *Molecular nutrition & food research*, v. 54, n. 5, p. 710–718, maio 2010.

MUNTEANU, A.; ZINGG, J.-M.; AZZI, A. Anti-atherosclerotic effects of vitamin E--myth or reality? *Journal of cellular and molecular medicine*, v. 8, n. 1, p. 59–76, mar. 2004.

MURPHY, K. M. *et al.* Bcl-2 inhibits Bax translocation from cytosol to mitochondria during drug-induced apoptosis of human tumor cells. *Cell death and differentiation*, v. 7, n. 1, p. 102–111, jan. 2000.

MURPHY, S. P.; SUBAR, A. F.; BLOCK, G. Vitamin E Intakes and Sources in the United States. *The American Journal of Clinical Nutrition*, v. 52, n. 2, p. 361–367, jan. 1990.

MURRAY, F.; HUTSON, P. H. Hippocampal Bcl-2 expression is selectively increased following chronic but not acute treatment with antidepressants, 5-HT(1A) or 5-HT(2C/2B) receptor antagonists. *European journal of pharmacology*, v. 569, n. 1-2, p. 41–47, ago. 2007.

MYINT, A.-M.; SCHWARZ, M. J.; MÜLLER, N. The role of the kynurenine metabolism in major depression. *Journal of neural transmission*, v. 119, n. 2, p. 245–251, fev. 2012.

NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES. INSTITUTE OF MEDICINE. FOOD AND NUTRITION BOARD. *DRI – Dietary Reference Intake*. . [S.l: s.n.]. Disponível em:

<<http://fnic.nal.usda.gov/dietary-guidance/dietary-reference-intakes/dri-tables>>, 2010.

NEMEROFF, C. B. The burden of severe depression: a review of diagnostic challenges and treatment alternatives. *Journal of Psychiatric Research*, v. 41, n. 3-4, p. 189–206, jun. 2007.

NEMEROFF, C. B.; OWENS, M. J. Treatment of mood disorders. *Nature Neuroscience*, v. 5 Suppl, p. 1068–1070, nov. 2002.

NESTLER, E. J. *et al.* Neurobiology of depression. *Neuron*, v. 34, n. 1, p. 13–25, 28 mar. 2002.

NESTLER, E. J.; HYMAN, S. E. Animal models of neuropsychiatric disorders. *Nature neuroscience*, v. 13, n. 10, p. 1161–1169, out. 2010.

NG, L.-T.; KO, H.-J. Comparative effects of tocotrienol-rich fraction,  $\alpha$ -tocopherol and  $\alpha$ -tocopheryl acetate on inflammatory mediators and nuclear factor kappa B expression in mouse peritoneal macrophages. *Food chemistry*, v. 134, n. 2, p. 920–925, set. 2012.

NICKOLA, T. J. *et al.* Antidepressant Drug-Induced Alterations in Neuron-Localized Tumor Necrosis Factor- $\alpha$  mRNA and  $\alpha$ 2-Adrenergic Receptor Sensitivity. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, v. 297, n. 2, p. 680–687, jan. 2001.

NICOLETTI, G. *et al.* Plasma levels of vitamin E in Parkinson's disease. *Archives of Gerontology and Geriatrics*, v. 33, n. 1, p. 7–12, ago. 2001.

NING, Y. *et al.* Interferon Gamma Restores Breast Cancer Sensitivity to Fulvestrant by Regulating STAT1, IRF1, NF $\kappa$ B, BCL2 Family Members, and Signaling to Caspase-dependent Apoptosis. *Molecular cancer therapeutics*, v. 9, n. 5, p. 1274–1285, maio 2010.

NISHIDA, A. *et al.* Antidepressant drugs and cytokines in mood disorders. *International Immunopharmacology*, v. 2, n. 12, p. 1619–1626, nov. 2002.

NORTHOFF, G. Gene, brains, and environment-genetic neuroimaging of depression. *Current opinion in neurobiology*, set. 2012.

NUMAKAWA, Y. *et al.* Vitamin E protected cultured cortical neurons from oxidative stress-induced cell death through the activation of mitogen-activated protein kinase and phosphatidylinositol 3-kinase. *Journal of neurochemistry*, v. 97, n. 4, p. 1191–1202, maio 2006.

NUTT, D. J. The role of dopamine and norepinephrine in depression and antidepressant treatment. *The Journal of clinical psychiatry*, v. 67 Suppl 6, p. 3–8, 2006.

O'BRIEN, S. M.; SCOTT, L. V.; DINAN, T. G. Cytokines: abnormalities in major depression and implications for pharmacological treatment. *Human Psychopharmacology*, v. 19, n. 6, p. 397–403, ago. 2004.

O'LEARY, K. A. *et al.* Effect of flavonoids and vitamin E on cyclooxygenase-2 (COX-2) transcription. *Mutation research*, v. 551, n. 1-2, p. 245–254, jul. 2004.

O'SULLIVAN, J. B. *et al.* Noradrenaline reuptake inhibitors limit neuroinflammation in rat cortex following a systemic inflammatory challenge: implications for depression and neurodegeneration. *The International Journal of Neuropsychopharmacology*, v. 12, n. 5, p. 687–699, jun. 2009.

OLIVEIRA, C. S. *et al.* The activation of ERK1/2 and p38 mitogen-activated protein kinases is dynamically regulated in the developing rat visual system. *International journal of developmental neuroscience*, v. 26, n. 3-4, p. 355–362, jun. 2008.

ORTEGA, R. M. *et al.* Cognitive function in elderly people is influenced by vitamin E status. *The Journal of Nutrition*, v. 132, n. 7, p. 2065–2068, jul. 2002.

OWEN, A. J. *et al.* Low plasma vitamin E levels in major depression: diet or disease? *European Journal of Clinical Nutrition*, v. 59, n. 2, p. 304–306, fev. 2005.

PÁEZ-PEREDA, M. New drug targets in the signaling pathways activated by antidepressants. *Progress in neuro-psychopharmacology & biological psychiatry*, v. 29, n. 6, p. 1010–1016, jul. 2005.

PANDEY, G. N. *et al.* GSK-3 $\beta$  gene expression in human postmortem brain: regional distribution, effects of age and suicide. *Neurochemical research*, v. 34, n. 2, p. 274–285, fev. 2009.

PARIANTE, C. M.; MILLER, A. H. Glucocorticoid receptors in major depression: relevance to pathophysiology and treatment. *Biological Psychiatry*, v. 49, n. 5, p. 391–404, mar. 2001.

PARK, S. H. *et al.* Tumor necrosis factor induces GSK3 kinase-mediated cross-tolerance to endotoxin in macrophages. *Nature immunology*, v. 12, n. 7, p. 607–615, jul. 2011.

PARVEEN, T. *et al.* Repeated administration of vitamin E decreases 5HIAA levels producing antidepressant effect and enhance behavioural effects. *Pakistan Journal of Biochemistry and Molecular Biology* s, v. 43, n. 4, out. 2011.

PASBAKHSH, P. *et al.* The protective effect of vitamin E on locus coeruleus in early model of Parkinson's disease in rat: immunoreactivity evidence. *Iranian biomedical journal*, v. 12, n. 4, p. 217–222, out. 2008.

PATEL, H. C. *et al.* Neurodegenerative actions of interleukin-1 in the rat brain are mediated through increases in seizure activity. *Journal of neuroscience research*, v. 83, n. 3, p. 385–391, fev. 2006.

PERERA, T. D. *et al.* Antidepressant-Induced Neurogenesis in the Hippocampus of Adult Nonhuman Primates. *The Journal of Neuroscience*, v. 27, n. 18, p. 4894–4901, fev. 2007.

PETERSEN, R. C. *et al.* Vitamin E and donepezil for the treatment of mild cognitive impairment. *The New England journal of medicine*, v. 352, n. 23, p. 2379–2388, jun. 2005.

PETERSON, G. L. A simplification of the protein assay method of Lowry *et al.* which is more generally applicable. *Analytical Biochemistry*, v. 83, n. 2, p. 346–356, dez. 1977.

PICCHINI, A. M.; MANJI, H. K.; GOULD, T. D. GSK-3 and neurotrophic signaling: novel targets underlying the pathophysiology and treatment of mood disorders? *Drug Discovery Today: Disease Mechanisms*, v. 1, n. 4, p. 419–428, dez. 2004.

PING, F. *et al.* 5-HT(1A) receptor and apoptosis contribute to interferon- $\alpha$ -induced “depressive-like” behavior in mice. *Neuroscience letters*, v. 514, n. 2, p. 173–178, abr. 2012.

PLATT, S. R. The role of glutamate in central nervous system health and disease-a review. *Veterinary journal*, v. 173, n. 2, p. 278–286, mar. 2007.

POLESZAK, E. *et al.* Immobility stress induces depression-like behavior in the forced swim test in mice: effect of magnesium and imipramine. *Pharmacological Reports*. v. 58, p.746-752, 2006.

PORSOLT, R. D.; BERTIN, A.; JALFRE, M. Behavioral despair in mice: a primary screening test for antidepressants. *Archives Internationales De Pharmacodynamie Et De Thérapie*, v. 229, n. 2, p. 327–336, out. 1977.

POSENER, J. A. *et al.* High-Dimensional Mapping of the Hippocampus in Depression. *American Journal of Psychiatry*, v. 160, n. 1, p. 83–89, jan. 2003.

POSSER, T. *et al.* Exposure of C6 glioma cells to Pb(II) increases the phosphorylation of p38(MAPK) and JNK1/2 but not of ERK1/2. *Archives of toxicology*, v. 81, n. 6, p. 407–414, jun. 2007.

POST, A. *et al.* Mechanisms Underlying the Protective Potential of  $\alpha$ -Tocopherol (Vitamin E) against Haloperidol-associated Neurotoxicity, v. 26, n. 3, p. 397–407, set. 2001.

PRICE, R. B. *et al.* Effects of intravenous ketamine on explicit and implicit measures of suicidality in treatment-resistant depression. *Biological psychiatry*, v. 66, n. 5, p. 522–526, set. 2009.

PRINS, J.; OLIVIER, B.; KORTE, S. M. Triple reuptake inhibitors for treating subtypes of major depressive disorder: the monoamine hypothesis revisited. *Expert opinion on investigational drugs*, v. 20, n. 8, p. 1107–1130, ago. 2011.

QIN, X.-Y. *et al.* Potential protection of curcumin against amyloid  $\beta$ -induced toxicity on cultured rat prefrontal cortical neurons. *Neuroscience Letters*, v. 463, n. 2, p. 158–161, out. 2009.



RADA, P. *et al.* Glutamate release in the nucleus accumbens is involved in behavioral depression during the PORSOILT swim test. *Neuroscience*, v. 119, n. 2, p. 557–565, 2003.

RAGOT, K. *et al.*  $\alpha$ -Tocopherol impairs 7-ketocholesterol-induced caspase-3-dependent apoptosis involving GSK-3 activation and Mcl-1 degradation on 158N murine oligodendrocytes. *Chemistry and Physics of Lipids*, v. 164, n. 6, p. 469–478, set. 2011.

RAISON, C L *et al.* CSF concentrations of brain tryptophan and kynurenines during immune stimulation with IFN- $\alpha$ : relationship to CNS immune responses and depression. *Molecular psychiatry*, v. 15, n. 4, p. 393–403, abr. 2010.

RAISON, CHARLES L; CAPURON, L.; MILLER, A. H. Cytokines sing the blues: inflammation and the pathogenesis of depression. *Trends in Immunology*, v. 27, n. 1, p. 24–31, jan. 2006.

REBOUL, E. *et al.* Scavenger receptor class B type I (SR-BI) is involved in vitamin E transport across the enterocyte. *The Journal of Biological Chemistry*, v. 281, n. 8, p. 4739–4745, fev. 2006.

REITER, E.; JIANG, Q.; CHRISTEN, S. Anti-inflammatory properties of alpha- and gamma-tocopherol. *Molecular Aspects of Medicine*, v. 28, n. 5-6, p. 668–691, dez. 2007.

REYNOLDS, J. L. *et al.* Brain-Derived Tumor Necrosis Factor- $\alpha$  and Its Involvement in Noradrenergic Neuron Functioning Involved in the Mechanism of Action of an Antidepressant. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, v. 310, n. 3, p. 1216–1225, jan. 2004.

RICCIARELLI, R.; ZINGG, J. M.; AZZI, A. Vitamin E 80th anniversary: a double life, not only fighting radicals. *IUBMB Life*, v. 52, n. 1-2, p. 71–76, jul. 2001.

RIEDL, S. J.; SHI, Y. Molecular mechanisms of caspase regulation during apoptosis. *Nature reviews. Molecular cell biology*, v. 5, n. 11, p. 897–907, nov. 2004.

RISCH, S. C.; NEMEROFF, C. B. Neurochemical alterations of serotonergic neuronal systems in depression. *The Journal of clinical psychiatry*, v. 53 Suppl, p. 3–7, out. 1992.

RODIONOVA, E. *et al.* GSK-3 mediates differentiation and activation of proinflammatory dendritic cells. *Blood*, v. 109, n. 4, p. 1584–1592, fev. 2007.

RODRIGUES, A. L. S. *et al.* Involvement of monoaminergic system in the antidepressant-like effect of the hydroalcoholic extract of *Siphocampylus verticillatus*. *Life Sciences*, v. 70, n. 12, p. 1347–1358, fev. 2002.

ROGÓZ, Z. *et al.* Synergistic effect of uncompetitive NMDA receptor antagonists and antidepressant drugs in the forced swimming test in rats. *Neuropharmacology*, v. 42, n. 8, p. 1024–1030, jun. 2002.

ROSA, A. O. *et al.* Antidepressant-like effect of the novel thiadiazolidinone NP031115 in mice. *Progress in neuro-psychopharmacology & biological psychiatry*, v. 32, n. 6, p. 1549–1556, ago. 2008.

ROTA, C. *et al.* Dietary vitamin E modulates differential gene expression in the rat hippocampus: potential implications for its neuroprotective properties. *Nutritional neuroscience*, v. 8, n. 1, p. 21–29, fev. 2005.

RUHÉ, H. G. *et al.* Staging methods for treatment resistant depression. A systematic review. *Journal of Affective Disorders*, mar. 2011.

RUSSO, S. *et al.* Tryptophan as an evolutionarily conserved signal to brain serotonin: molecular evidence and psychiatric implications. *The world journal of biological psychiatry: the official journal of the World Federation of Societies of Biological Psychiatry*, v. 10, n. 4, p. 258–268, 2009.

SACRE, S. *et al.* Fluoxetine and citalopram exhibit potent antiinflammatory activity in human and murine models of rheumatoid arthritis and inhibit toll-like receptors. *Arthritis & Rheumatism*, v. 62, n. 3, p. 683–693, jan. 2010.

SAHAY, A.; HEN, R. Adult hippocampal neurogenesis in depression. *Nature Neuroscience*, v. 10, n. 9, p. 1110–1115, 2007.

SAMUELS, B. A.; HEN, R. Neurogenesis and affective disorders. *European Journal of Neuroscience*, v. 33, n. 6, p. 1152–1159, 2011.

SANACORA, G. *et al.* Targeting the Glutamatergic System to Develop Novel, Improved Therapeutics for Mood Disorders. *Nature reviews. Drug discovery*, v. 7, n. 5, p. 426–437, maio 2008.

SANACORA, G.; TRECCANI, G.; POPOLI, M. Towards a glutamate hypothesis of depression: an emerging frontier of neuropsychopharmacology for mood disorders. *Neuropharmacology*, v. 62, n. 1, p. 63–77, jan. 2012.

SANTARELLI, L. *et al.* Requirement of Hippocampal Neurogenesis for the Behavioral Effects of Antidepressants. *Science*, v. 301, n. 5634, p. 805–809, ago. 2003.

SAPOLSKY, R. M. The possibility of neurotoxicity in the hippocampus in major depression: a primer on neuron death. *Biological Psychiatry*, v. 48, n. 8, p. 755–765, out. 2000.

SARANDOL, A. *et al.* Major depressive disorder is accompanied with oxidative stress: short-term antidepressant treatment does not alter oxidative-antioxidative systems. *Human Psychopharmacology*, v. 22, n. 2, p. 67–73, mar. 2007.

SAREMI, A.; ARORA, R. Vitamin E and cardiovascular disease. *American journal of therapeutics*, v. 17, n. 3, p. e56–65, jun. 2010.

SCHIEPERS, O. J. G.; WICHERS, M. C.; MAES, M. Cytokines and major depression. *Progress in Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry*, v. 29, n. 2, p. 201–217, fev. 2005.

SCHILDKRAUT, J. J. The Catecholamine Hypothesis of Affective Disorders: A Review of Supporting Evidence. *American Journal of Psychiatry*, v. 122, n. 5, p. 509–522, nov. 1965.

SCHNEIDER, C. Chemistry and biology of vitamin E. *Molecular Nutrition & Food Research*, v. 49, n. 1, p. 7–30, jan. 2005.

SCHUBERT, D.; PIASECKI, D. Oxidative Glutamate Toxicity Can Be a Component of the Excitotoxicity Cascade. *The Journal of Neuroscience*, v. 21, n. 19, p. 7455–7462, jan. 2001.

SEN, C. K. *et al.* Molecular Basis of Vitamin E Action -Tocotrienol Potently Inhibits Glutamate-Induced pp60c-Src Kinase Activation and Death of HT4 Neuronal Cells. *Journal of Biological Chemistry*, v. 275, n. 17, p. 13049–13055, abr. 2000.

SERRETTI, A.; MANDELLI, L. Antidepressants and body weight: a comprehensive review and meta-analysis. *The Journal of Clinical Psychiatry*, v. 71, n. 10, p. 1259–1272, out. 2010.

SHAH, S.; SYLVESTER, P. W. Tocotrienol-Induced Caspase-8 Activation Is Unrelated to Death Receptor Apoptotic Signaling in Neoplastic Mammary Epithelial Cells. *Experimental Biology and Medicine*, v. 229, n. 8, p. 745–755, jan. 2004.

SHAH, S. J.; SYLVESTER, P. W. Gamma-tocotrienol inhibits neoplastic mammary epithelial cell proliferation by decreasing Akt and nuclear factor kappaB activity. *Experimental biology and medicine*, v. 230, n. 4, p. 235–241, abr. 2005.

SHELINE, Y. I.; GADO, M. H.; KRAEMER, H. C. Untreated Depression and Hippocampal Volume Loss. *American Journal of Psychiatry*, v. 160, n. 8, p. 1516–1518, ago. 2003.

SHEN, E.; FAN, J.; PENG, T. Glycogen synthase kinase-3beta suppresses tumor necrosis factor-alpha expression in cardiomyocytes during lipopolysaccharide stimulation. *Journal of cellular biochemistry*, v. 104, n. 1, p. 329–338, maio 2008.

SHIBATA, H. *et al.* Relationship of serum cholesterol and vitamin E to depressive status in the elderly. *Journal of Epidemiology*, v. 9, n. 4, p. 261–267, ago. 1999.

SHINDE, S. N.; DHADKE, V. N.; SURYAKAR, A. N. Evaluation of Oxidative Stress in Type 2 Diabetes Mellitus and Follow-up Along with Vitamin E Supplementation. *Indian journal of clinical biochemistry*, v. 26, n. 1, p. 74–77, jan. 2011.

SHIN-KANG, S. *et al.* Tocotrienols inhibit AKT and ERK activation and suppress pancreatic cancer cell proliferation by suppressing the ErbB2 pathway. *Free radical biology & medicine*, v. 51, n. 6, p. 1164–1174, set. 2011.

SIMEN, B. B. *et al.* TNF-alpha signaling in depression and anxiety: behavioral consequences of individual receptor targeting. *Biological psychiatry*, v. 59, n. 9, p. 775–785, maio 2006.

SIMON, G. E. Social and economic burden of mood disorders. *Biological Psychiatry*, v. 54, n. 3, p. 208–215, ago. 2003.

SINGH, U.; DEVARAJ, S.; JIALAL, I. Vitamin E, oxidative stress, and inflammation. *Annual Review of Nutrition*, v. 25, p. 151–174, 2005.

SINHA, P. *et al.* Vitamin E deficiency sensitizes alveolar type II cells for apoptosis. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids*, v. 1583, n. 1, p. 91–98, jun. 2002.

SKOLNICK, P. Antidepressants for the new millennium. *European Journal of Pharmacology*, v. 375, n. 1–3, p. 31–40, jun. 1999.

SMOLAREK, A. K. *et al.* Dietary tocopherols inhibit cell proliferation, regulate expression of ER $\alpha$ , PPAR $\gamma$ , and Nrf2, and decrease serum inflammatory markers during the development of mammary hyperplasia. *Molecular carcinogenesis*, mar. 2012.

STAHL, S. M. *et al.* A Review of the Neuropharmacology of Bupropion, a Dual Norepinephrine and Dopamine Reuptake Inhibitor. *Primary Care Companion to The Journal of Clinical Psychiatry*, v. 6, n. 4, p. 159–166, 2004.

STEINERT, J. R.; CHERNOVA, T.; FORSYTHE, I. D. Nitric Oxide Signaling in Brain Function, Dysfunction, and Dementia. *The Neuroscientist*, v. 16, n. 4, p. 435–452, jan. 2010.

STERU, L. *et al.* The tail suspension test: a new method for screening antidepressants in mice. *Psychopharmacology*, v. 85, n. 3, p. 367–370, 1985.

STONE, T. W.; DARLINGTON, L. G. Endogenous kynurenes as targets for drug discovery and development. *Nature Reviews Drug Discovery*, v. 1, n. 8, p. 609–620, jan. 2002.

STRIJBOS, P. J. L. M.; LEACH, M. J.; GARTHWAITE, J. Vicious Cycle Involving Na<sup>+</sup> Channels, Glutamate Release, and NMDA Receptors Mediates Delayed Neurodegeneration through Nitric Oxide Formation. *The Journal of Neuroscience*, v. 16, n. 16, p. 5004–5013, ago. 1996.

SU, H.-C. *et al.* Glycogen synthase kinase-3 $\beta$  regulates anti-inflammatory property of fluoxetine. *International immunopharmacology*, v. 14, n. 2, p. 150–156, out. 2012.

SUBLETTE, M. E. *et al.* Meta-analysis of the effects of eicosapentaenoic acid (EPA) in clinical trials in depression. *The Journal of Clinical Psychiatry*, v. 72, n. 12, p. 1577–1584, dez. 2011.

SUN, M.-K.; ALKON, D. L. Synergistic effects of chronic bryostatin-1 and alpha-tocopherol on spatial learning and memory in rats. *European Journal of Pharmacology*, v. 584, n. 2-3, p. 328–337, abr. 2008.

SUNG, S. *et al.* Early vitamin E supplementation in young but not aged mice reduces A $\beta$  levels and amyloid deposition in a transgenic model of Alzheimer's disease. *FASEB journal*, v. 18, n. 2, p. 323–325, fev. 2004.

SYLVESTER, P. W.; SHAH, S. J.; SAMANT, G. V. Intracellular signaling mechanisms mediating the antiproliferative and apoptotic effects of  $\gamma$ -tocotrienol in neoplastic mammary epithelial cells. *Journal of Plant Physiology*, v. 162, n. 7, p. 803–810, jul. 2005.

SZABO, S. T.; BLIER, P. Effect of the selective noradrenergic reuptake inhibitor reboxetine on the firing activity of noradrenaline and serotonin neurons. *The European journal of neuroscience*, v. 13, n. 11, p. 2077–2087, jun. 2001.

TAKATSU, H. *et al.* Effect of vitamin E on learning and memory deficit in aged rats. *Journal of Nutritional Science and Vitaminology*, v. 55, n. 5, p. 389–393, 2009.

TALER, M. *et al.* Evidence for an inhibitory immunomodulatory effect of selected antidepressants on rat splenocytes: Possible relevance to depression and hyperactive-immune disorders. *International Immunopharmacology*, v. 8, n. 4, p. 526–533, abr. 2008.

TALER, M. *et al.* Immunomodulatory effect of selective serotonin reuptake inhibitors (SSRIs) on human T lymphocyte function and gene expression. *European Neuropsychopharmacology*, v. 17, n. 12, p. 774–780, dez. 2007.

TAYLOR, C. *et al.* Mechanisms of action of antidepressants: from neurotransmitter systems to signaling pathways. *Cellular Signalling*, v. 17, n. 5, p. 549–557, maio 2005.

TCHELINGERIAN, J. L.; VIGNAIS, L.; JACQUE, C. TNF alpha gene expression is induced in neurones after a hippocampal lesion. *Neuroreport*, v. 5, n. 5, p. 585–588, jan. 1994.

TIEMEIER, H. *et al.* Vitamin E and depressive symptoms are not related. The Rotterdam Study. *Journal of Affective Disorders*, v. 72, n. 1, p. 79–83, out. 2002.

TIERNEY, J. G. Treatment-resistant depression: managed care considerations. *Journal of Managed Care Pharmacy*, v. 13, n. 6 Suppl A, p. S2–7, jul. 2007.

TIROSH, O. *et al.* Cellular and mitochondrial changes in glutamate-induced HT4 neuronal cell death. *Neuroscience*, v. 97, n. 3, p. 531–541, maio 2000.

TRABER, M. G. Vitamin E regulatory mechanisms. *Annual Review of Nutrition*, v. 27, p. 347–362, 2007.

TRABER, M. G.; SIES, H. Vitamin E in Humans: Demand and Delivery. *Annual Review of Nutrition*, v. 16, n. 1, p. 321–317, 1996.

TRONCHINI, E. A.; DE MIRANDA NETO, M. H.; ZANONI, J. N. Vitamin E ( $\alpha$ -tocopherol) supplementation enhances nitric oxide production in penile tissue of diabetic rats. *BJU international*, v. 106, n. 11, p. 1788–1793, dez. 2010.

TSANKOVA, N. *et al.* Epigenetic regulation in psychiatric disorders. *Nat Rev Neurosci*, v. 8, n. 5, p. 355–367, maio 2007.

TSUBOI, H. *et al.* Possible connections among job stress, depressive symptoms, lipid modulation and antioxidants. *Journal of Affective Disorders*, v. 91, n. 1, p. 63–70, mar. 2006.

TSUBOI, M. *et al.* Tumor necrosis factor-alpha and interleukin-1beta increase the Fas-mediated apoptosis of human osteoblasts. *Journal of Laboratory and Clinical Medicine*. v. 134, p. 222–31, set. 1999.

TUCKER, J. M.; TOWNSEND, D. M. Alpha-tocopherol: roles in prevention and therapy of human disease. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, v. 59, n. 7, p. 380–387, ago. 2005.

TUGLU, C. *et al.* Increased serum tumor necrosis factor-alpha levels and treatment response in major depressive disorder. *Psychopharmacology*, v. 170, n. 4, p. 429–433, dez. 2003.

TZIFI, F. *et al.* The Role of BCL2 Family of Apoptosis Regulator Proteins in Acute and Chronic Leukemias. *Advances in Hematology*, v. 2012, 2012.

TZSCHENTKE, T. M. Glutamatergic mechanisms in different disease states: overview and therapeutical implications - an introduction. *Amino acids*, v. 23, n. 1-3, p. 147–152, 2002.

VAKILI, K. *et al.* Hippocampal volume in primary unipolar major depression: a magnetic resonance imaging study. *Biological psychiatry*, v. 47, n. 12, p. 1087–1090, jun. 2000.

VANDENABEELE, P.; ORRENIUS, S.; ZHIVOTOVSKY, B. Serine proteases and calpains fulfill important supporting roles in the apoptotic tragedy of the cellular opera. *Cell death and differentiation*, v. 12, n. 9, p. 1219–1224, set. 2005.

VATASSERY, G. T. *et al.* Alpha and gamma tocopherols in cerebrospinal fluid and serum from older, male, human subjects. *Journal of the American College of Nutrition*, v. 23, n. 3, p. 233–238, jun. 2004.



VENNA, V. R. *et al.* PUFA induce antidepressant-like effects in parallel to structural and molecular changes in the hippocampus. *Psychoneuroendocrinology*, v. 34, n. 2, p. 199–211, fev. 2009.

VETULANI, J.; NALEPA, I. Antidepressants: past, present and future. *European Journal of Pharmacology*, v. 405, n. 1–3, p. 351–363, set. 2000.

VIVIANI, B. *et al.* Cytokines role in neurodegenerative events. *Toxicology Letters*, v. 149, n. 1–3, p. 85–89, abr. 2004.

VON WOLFF, A. *et al.* Selective serotonin reuptake inhibitors and tricyclic antidepressants in the acute treatment of chronic depression and dysthymia: A systematic review and meta-analysis. *Journal of affective disorders*, set. 2012.

WANG, S.-H. *et al.* Cadmium Toxicity toward Autophagy through ROS-Activated GSK-3 $\beta$  in Mesangial Cells. *Toxicological Sciences*, v. 108, n. 1, p. 124–131, mar. 2009.

WANG, Y. M. *et al.* Genetic approaches to studying norepinephrine function: knockout of the mouse norepinephrine transporter gene. *Biological psychiatry*, v. 46, n. 9, p. 1124–1130, nov. 1999.

WATKINS, L. R.; MAIER, S. F.; GOEHLER, L. E. Immune activation: the role of pro-inflammatory cytokines in inflammation, illness responses and pathological pain states. *Pain*, v. 63, n. 3, p. 289–302, dez. 1995.

WEDZONY, K. *et al.* Single doses of MK-801, a non-competitive antagonist of NMDA receptors, increase the number of 5-HT<sub>1A</sub> serotonin receptors in the rat brain. *Brain research*, v. 756, n. 1–2, p. 84–91, maio 1997.

WEGENER, G. *et al.* Local, but not systemic, administration of serotonergic antidepressants decreases hippocampal nitric oxide synthase activity. *Brain research*, v. 959, n. 1, p. 128–134, jan. 2003.

WHOOLEY, M. A. To Screen or Not to Screen?: Depression in Patients With Cardiovascular Disease. *Journal of the American College of Cardiology*, v. 54, n. 10, p. 891–893, set. 2009.

WICHERS, M. C.; MAES, M. The role of indoleamine 2,3-dioxygenase (IDO) in the pathophysiology of interferon-alpha-induced depression. *Journal of Psychiatry & Neuroscience*, v. 29, n. 1, p. 11–17, jan. 2004.

WILKES, S. Bupropion. *Drugs of today*, v. 42, n. 10, p. 671–681, out. 2006.

WOLKOWITZ, O. M.; REUS, V. I.; MELLON, S. H. Of sound mind and body: depression, disease, and accelerated aging. *Dialogues in Clinical Neuroscience*, v. 13, n. 1, p. 25–39, 2011.

WONG, D. T.; PERRY, K. W.; BYMASTER, F. P. The Discovery of Fluoxetine Hydrochloride (Prozac). *Nature Reviews Drug Discovery*, v. 4, n. 9, p. 764–774, ago. 2005.

WONG, M.-L.; LICINIO, J. Research and treatment approaches to depression. *Nat Rev Neurosci*, v. 2, n. 5, p. 343–351, maio 2001.

WU, D.; MEYDANI, S. N. Age-associated changes in immune and inflammatory responses: impact of vitamin E intervention. *Journal of Leukocyte Biology*, v. 84, n. 4, p. 900–914, out. 2008.

XIA, Z.; DEPIERRE, J. W.; NÄSSBERGER, L. Tricyclic antidepressants inhibit IL-6, IL-1 beta and TNF-alpha release in human blood monocytes and IL-2 and interferon-gamma in T cells. *Immunopharmacology*, v. 34, n. 1, p. 27–37, ago. 1996.

YAM, M.-L. *et al.* Tocotrienols suppress proinflammatory markers and cyclooxygenase-2 expression in RAW264.7 macrophages. *Lipids*, v. 44, n. 9, p. 787–797, set. 2009.

YAMADA, J.; SUGIMOTO, Y.; YAMADA, S. Involvement of dopamine receptors in the anti-immobility effects of dopamine re-uptake inhibitors in the forced swimming test. *European Journal of Pharmacology*, v. 504, n. 3, p. 207–211, nov. 2004.

YAMADA, K. *et al.* Neurobehavioral alterations in mice with a targeted deletion of the tumor necrosis factor-alpha gene: implications for emotional behavior. *Journal of neuroimmunology*, v. 111, n. 1-2, p. 131–138, nov. 2000.

YANG, C. S. *et al.* Inhibition of Inflammation and Carcinogenesis in the Lung and Colon by Tocopherols. *Annals of the New York Academy of Sciences*, v. 1203, p. 29–34, ago. 2010.

YANG, T.-T.; WANG, S.-J. Facilitatory effect of glutamate exocytosis from rat cerebrocortical nerve terminals by  $\alpha$ -tocopherol, a major vitamin E component. *Neurochemistry International*, v. 52, n. 6, p. 979–989, maio 2008.

YANIK, M.; EREL, O.; KATI, M. The relationship between potency of oxidative stress and severity of depression. *Acta Neuropsychiatrica*, v. 16, n. 4, p. 200–203, ago. 2004.

YILDIZ, F. *et al.* Antidepressant-like effect of 7-nitroindazole in the forced swimming test in rats. *Psychopharmacology*, v. 149, n. 1, p. 41–44, mar. 2000.

ZAKHAROVA, I. O. *et al.*  $\alpha$ -Tocopherol at Nanomolar Concentration Protects PC12 Cells from Hydrogen Peroxide-Induced Death and Modulates Protein Kinase Activities. *International Journal of Molecular Sciences*, v. 13, n. 9, p. 11543–11568, set. 2012.

ZAL, F. *et al.* Effect of vitamin E and C supplements on lipid peroxidation and GSH-dependent antioxidant enzyme status in the blood of women consuming oral contraceptives. *Contraception*, abr. 2012.

ZARATE, C. *et al.* Glutamatergic Modulators: The Future of Treating Mood Disorders?. *Harvard review of psychiatry*, v. 18, n. 5, p. 293–303, out. 2010.

ZARATE, C. A., Jr *et al.* A randomized trial of an N-methyl-D-aspartate antagonist in treatment-resistant major depression. *Archives of general psychiatry*, v. 63, n. 8, p. 856–864, ago. 2006.

ZHU, C. B.; BLAKELY, R. D.; HEWLETT, W. A. The proinflammatory cytokines interleukin-1 $\beta$  and tumor necrosis factor- $\alpha$  activate serotonin transporters. *Neuropsychopharmacology*, v. 31, n. 10, p. 2121–2131, out. 2006.

ZOMKOWSKI, A.D. *et al.* The role of the NMDA receptors and l-arginine-nitric oxide-cyclic guanosine monophosphate pathway in the

antidepressant-like effect of duloxetine in the forced swimming test. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*. v.103, n. 2, p.408-417, dez. 2012.

ZUNSZAIN, P. A.; HEPGUL, N.; PARIANTE, C. M. Inflammation and Depression. *Current topics in behavioral neurosciences*, maio 2012.